

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09070289 A**

(43) Date of publication of application: **18 . 03 . 97**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C07H 21/04
C07K 14/705
C07K 14/72
C07K 16/28
C12N 1/21
C12P 21/02
C12Q 1/68
G01N 33/566
// A61K 38/00
A61K 38/00
A61K 38/00
A61K 38/04
A61K 38/04
(C12N 1/21 , C12R 1:19) , (C12P
21/02 , C12R 1:19)

(21) Application number: **07237081**

(22) Date of filing: **14 . 09 . 95**

(30) Priority: **27 . 06 . 95 JP 07161213**

(71) Applicant: **TAKEDA CHEM IND LTD**

(72) Inventor: **HINUMA KUNIIJI**
ITO YASUAKI
FUKUZUMI MASASHI

(54) HUMAN CRF2 RECEPTER PROTEIN, ITS PRODUCTION AND USE

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new DNA for production, etc., of a human CRF₂ receptor protein having a specific base sequence and useful for a primer, etc., for polymerase chain reaction of DNA coding a G protein conjugated receptor protein.

SOLUTION: This new DNA has substantially same base sequence as a base sequence represented by formula I or II and is useful as a DNA primer, etc., used for polymerase chain reaction of DNA coding a G protein-conjugated receptor protein. This human CRF₂ receptor protein is obtained by expressing a gene cloned by polymerase chain reaction using the DNA as a primer. The receptor protein is useful for screening an agonist such as a preventing and treating agent for dementia or obesity or a hypotensive agent and an antagonist for prevention and treatment, etc., of depression, inflammatory diseases, AIDS, Alzheimer's disease, gastrointestinal injury, reproductive failure, Cushing's disease, hypotension, etc.

5'-CATTAYTKGATSGYGRCCAAC
WCWNCTGG-3'

5'-GTAQARRAYAGCCACMAMRARN
CCCTGRAA-3'

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-70289

(43)公開日 平成9年(1997)3月18日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/705			C 0 7 K 14/705	
14/72			14/72	
16/28			16/28	

審査請求 未請求 請求項の数23 O L (全 46 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-237081

(22)出願日 平成7年(1995)9月14日

(31)優先権主張番号 特願平7-161213

(32)優先日 平7(1995)6月27日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 日沼 州司

茨城県つくば市春日1丁目7番地の9 武

田春日ハイツ1402号

(72)発明者 伊藤 康明

茨城県土浦市桜ヶ丘町36番地の16

(72)発明者 福住 昌司

茨城県つくば市並木3丁目17番地の6 ロ

イヤルシティ並木302号

(74)代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外2名)

(54)【発明の名称】 ヒトCRF₂レセプター蛋白質、その製造法および用途

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片のスクリーニングに有用なDNAプライマーの提供、さらにヒトCRF₂レセプター蛋白質、その製造法および用途の提供。

【解決手段】 公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域または第7膜貫通領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列に共通する塩基配列に相補的なDNA、該DNAを増幅しスクリーニングにより得られるDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチド、さらに、新規なヒトCRF₂レセプター蛋白質、をコードするDNAを含有するDNA、該ヒトCRF₂レセプター蛋白質の製造方法、及びスクリーニング用キットで得られるヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニスト、及び該レセプターアゴニストまたはアンタゴニストを含有する医薬組成物、該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：1または配列番号：2で表わされる塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有することを特徴とするDNA。

【請求項2】DNAがG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAのポリメラーゼ・チェーン・リアクションに用いられるDNAプライマーである請求項1記載のDNA。

【請求項3】鋳型となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAと請求項1記載のDNAを混合してポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行なうことを特徴とする該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅する方法。

【請求項4】請求項1記載のDNAをDNAプライマーとしてポリメラーゼ・チェーン・リアクションに用いることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAライブラリーからG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをスクリーニングする方法。

【請求項5】請求項4記載のスクリーニング方法で得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA。

【請求項6】請求項5記載のDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩。

【請求項7】配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその塩。

【請求項8】配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその塩。

【請求項9】請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項10】請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項11】配列番号：4で表される塩基配列を有する請求項10記載のDNA。

【請求項12】配列番号：15で表される塩基配列を有する請求項10記載のDNA。

【請求項13】請求項10記載のDNAを含有することを特徴とするベクター。

【請求項14】請求項13記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項15】請求項14記載の形質転換体を培養し、形質転換体の細胞膜にヒトCRF₂レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその塩の製造方法。

【請求項16】請求項7あるいは請求項8記載のヒトC 50

RF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項9記載の部分ペプチドもしくはその塩を用いることを特徴とするCRF₂レセプターを活性化するアゴニストもしくはその塩またはCRF₂レセプターとCRFとの結合を拮抗阻害するアンタゴニストもしくはその塩のスクリーニング方法。

【請求項17】(i)請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項9記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と(ii)請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項9記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、リガンドと請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項18】請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項9記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とする、リガンドと請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項19】請求項16もしくは請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られるヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはその塩。

【請求項20】請求項16もしくは請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られるヒトCRF₂レセプターアンタゴニストまたはその塩。

【請求項21】請求項19記載のヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはその塩を含有することを特徴とする痴呆症、肥満症の予防・治療剤、ストレスに対する適応促進剤、ACTH、β-エンドルフィン、β-リポトロピンもしくはα-MSFの分泌促進剤、血圧降下剤、気分や行動の調節剤、胃腸機能の調節剤、自律神経系の調節剤、または下垂体、心血管系、消化管もしくは中枢神経の機能検査薬。

【請求項22】請求項20記載のヒトCRF₂レセプターアンタゴニストまたはその塩を含有することを特徴とするストレスからくる鬱病・不安・頭痛、炎症性疾患、免疫抑制、AIDS、アルツハイマー病、胃腸障害、食欲不振、出血性ストレス、薬物・アルコールの禁断症状、薬物依存症、生殖障害、クッシング病または低血圧症の予防・治療剤。

【請求項23】請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項9記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション用のDNAプライマーとして有用な新規DNA、該DNAを用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの増幅方法、該DNAを用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAのスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られるDNAおよびスクリーニング方法で得られたDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに関する。さらに、本発明は、新規なCRF₂レセプター蛋白質、該蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、該CRF₂レセプター蛋白質の製造方法、および該蛋白質ならびにDNAの用途に関する。

【0002】

【従来の技術】G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。それぞれの分子に対して特異的なレセプター蛋白質が存在し、それによって個々の生理活性物質の作用の特異性、すなわち標的細胞・臓器、薬理作用、作用強度、作用時間等を決定している。したがって、G蛋白質共役型レセプター遺伝子あるいはcDNAをクローニングすることができれば、G蛋白質共役型レセプターの構造、機能、生理作用等の解明に役立つばかりでなく、レセプターに作用する物質を探索することにより、医薬品を開発するためにも役に立つと考えられている。これまでいくつかのG蛋白質共役型レセプター遺伝子あるいはcDNAがクローニングされているが、また未知のG蛋白質共役型レセプター遺伝子が数多く存在すると考えられている。

【0003】これまでに知られているG蛋白質共役型レセプター蛋白質の特徴として、一次構造上に疎水性アミノ酸残基のクラスターが7個配置し、それぞれの部分で細胞膜を貫通していることがあげられる。この構造は公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質すべてに共通であり、また、この膜貫通領域およびその近傍のアミノ酸配列はしばしばレセプター間で高度に保存されていることが知られている。未知の蛋白質がこのような構造を有する場合、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の範疇に入ること強く示唆される。また、一部のアミノ酸残基の配置には共通性があり、これらを特徴としてさらにG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることが強く示唆される。公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の比較から得た共通のアミノ酸配列をもとに合成DNAプライマーを合成し、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法（以下、PCR法と略称する場合がある）によって新規レセプター遺伝子の単離を行う方法がLibert F.らによって報告されている（Science 244: 569-572; 1989）。この報文において、Libert F.らは第3膜貫通領域および第6膜貫通領域の部分に相当する一組の合成DNAプライ

マーを用いている。しかし、一般にPCR法に用いるプライマーのデザインによって、増幅されるDNAの分子種が規定される。また、アミノ酸配列の類似性をもとにすれば、コドンの使用が異なった場合、プライマーの結合に影響を及ぼし、その結果、増幅効率の低下が引き起こされる。そのため、該DNAプライマーを用いて各種の新規レセプター蛋白質のDNAが得られてはいるが、すべてのレセプター蛋白質のDNAを増幅できるわけではない。

【0004】また、74種のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第1膜貫通領域～第7膜貫通領域に共通するアミノ酸配列がWilliam C. Probstらによって報告されている（DNA AND CELL BIOLOGY, Vol.11, No.1, 1992, pp 1-20）。しかし、これらアミノ酸配列をコードするDNAに相補的なDNAプライマーを用いるPCR法によって、新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをスクリーニングする方法については示唆されていない。したがって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはそれをコードするDNAの共通の配列を利用して、新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質のより全長に近い領域をコードするDNAを選択的に、かつ効率よくスクリーニングするためのPCR用DNAプライマーの開発が望まれていた。G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の機能を調節する物質を研究し、医薬品として開発を進める対象として非常に重要である。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用い、レセプター結合実験および細胞内情報伝達系を指標としたアゴニスト・アンタゴニストの評価実験等を行うことによって、新規医薬候補化合物の発見・開発を効率的に進めることができる。特に、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の存在を明らかにすれば、それに対する特異的な作用物質の存在が示唆される。新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを効率的にスクリーニングし単離することができれば、全コード領域を有するDNAの単離、発現系の構築、作用するリガンドのスクリーニングを効率的に進めることが可能となる。

【0005】Corticotropin-Releasing Factor（以下、CRFと略称する）は、はじめ1981年にヒツジ視床下部から単離されたアミノ酸41個から成るペプチドで、下垂体からACTH/ β -endorphin分泌を促進する活性を有する。その作用機構は、CRFが下垂体前葉のACTH産生細胞（Corticotroph）などのCRF標的細胞の細胞膜表面に存在するCRFレセプターに結合後、guanine nucleotide regulatory protein（G蛋白質）を介してadenylate cyclase-cyclic AMP-protein kinase系を活性化することによることが明らかにされている[Vale, W. et al., サイエンス (Science) 213巻、1394頁、1981年]。臨床的にも、合成CRFが下垂体機能低下症やCushing症候群の診断に広く応用されている。一方、CRFレセプターは下垂体のみならず、

大脳皮質灰白質、大脳基底核、視床下部室傍核、中央隆起外層、脳幹大脳神経核、オリブ核、小脳神経核、小脳皮質、嗅索、前障、扁桃、脊髄角など中枢神経系内に広く分布している [Vale, W.、コルチコトロピン・リリージング・ファクター (Corticotropin Releasing Factor)、172巻、1-21頁、1993年]。この分布はCRFニューロン終末の分布とほとんど一致しており、CRFがこれらの部分で neurotransmitter あるいは neuromodulator として作用しているものと考えられている。その他、CRFレセプターは、副腎髄質、交感神経節、前立腺、脾臓、肝臓、腎臓、睾丸、赤血球膜、脾マクロファージにも存在し、ストレス時には、下垂体ACTH/ β -endorphin 分泌促進作用のみならず、これらのレセプターを介して、行動、自律神経あるいは免疫系の反応などすべてのストレス適応反応に関与しているものと推測されている。

【0006】中枢神経系に存在するCRFレセプターの性状については、よく研究されていて例えばヒトCRFレセプターcDNAはクローニングされており、動物細胞(COS 7細胞 [Natalio Vita et al.、フェブス・レターズ (FEBS Letters)、335巻、1-5頁、1993年]、COS 6M細胞 [Ruoping Chen et al.、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、90巻、8967-8971頁、1993年])での発現も報告されている。しかし、本CRFレセプター(以下、CRF₁レセプターと記す)の体内での分布は、必ずしもCRFが作用する場所と一致していないことが判明していた。例えば、視床下部、脳幹、小腸、胃、精巣、心臓、骨格筋などには、CRFが作用することが示唆されていたが、CRF₁レセプターは、ごくわずかしかな存在しないか、全く存在しないことが示されていた [Owens, M. J., Nemeroff, C. B., ファーマコロジカル・レビュー (Pharmacol. Rev.) 43巻、425頁、1991年]、[Grunt, M. et al.、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー (Am. J. Physiol.) 264巻、H1124頁、1993年]、[Wei, E. T., Gao, G. C., レギュラトリー・ペプチド (Regul. Pept.) 33巻、93頁、1991年]、[Lenz, H. J. et al.、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー (Am. J. Physiol.) 249巻、R85頁、1985年]。これらのことから、CRF₁レセプター以外にもCRFをリガンドとするレセプターが存在する可能性が考えられていた。

【0007】最近、相次いで、CRF₁レセプターとは異なるCRFレセプター(以下、CRF₂レセプターと記す)が、ラットおよびマウスからクローニングされた [Lovenberg, T. W. et al.、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 92巻、836頁、1995年]、[Kishimoto, T. et al.、プロシーディング

・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 92巻、1108頁、1995年]、[Perrin, M. et al.、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 92巻、2969頁、1995年]。これによると、ラットCRF₂レセプターcDNAは411個のアミノ酸をコードしており、CRF₁レセプターとは約70%の相同性を有する7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプターである。またマウスCRF₂レセプターは、431個のアミノ酸からなることが判明した(上記のマウスCRF₂レセプターに関する論文の中では、本明細書のCRF₂レセプターをheart/muscle(HM)-CRFレセプターまたはCRFレセプターBの用語で記載されている)。一方、ラットとマウスで明らかにされたCRF₂レセプターがヒトでも存在するかどうかについてはまだ分かっていなかった。

【0008】CRFは多くの末梢組織(例えば胎盤、副腎髄質、脾臓、肺、胃、十二指腸、肝臓)に存在しており、またCRFおよびCRF類似ペプチドのソイベジンやウロテンシンIの投与により、末梢組織の全身性の反応が引き起こされることが示されている [Lenz, H. J. et al.、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー (Am. J. Physiol.) 249巻、R85頁、1985年]。上記のラットおよびマウスのCRF₂レセプターの研究から、中枢神経系の局所および末梢組織に分布しているCRFレセプターは、CRF₂レセプターであることが強く示唆されている。以上のことから、CRF₂レセプターに対するアゴニストあるいはアンタゴニストは、中枢神経系や末梢組織に作用する有用な薬物になり得ると期待される。ヒトの中枢神経系や末梢組織などに作用するような医薬としてのCRF₂レセプターに対するアゴニストあるいはアンタゴニストをスクリーニングしようとする場合は、1次スクリーニングとしてはヒトのCRF₂レセプターを発現している組織あるいは細胞を使ってそのレセプターに結合する物質をスクリーニングすることが考えられるが、ヒトのCRF₂レセプターが未確認でそのようなヒトの組織を入手することは事実上ほとんど不可能である。また、ヒトCRF₂レセプターを発現しているような培養細胞も知られていない。一方、ラットやマウスのCRF₂レセプターを発現している組織あるいは細胞を使ってスクリーニングすることは可能であるが、この場合には動物種間でのレセプターの特性の違い、いわゆるレセプターの種特異性が問題となってくる。以上に加えて、ヒトのCRF₂レセプターのcDNAが取得されていなかったため、ヒトCRF₂レセプターのシグナル伝達について調べる手段が全くなかった。

【0009】このような問題を解決する手段として、ヒトCRF₂レセプターcDNAをクローニングすることができれば、それを使って適当な手段によりヒトCRF

レセプターを昆虫細胞や動物細胞等に発現させることができるので、ヒトのCRF₂レセプターアゴニストあるいはアンタゴニストの探索および研究を大きく前進させることができるものと考えられるが、ヒトCRF₂レセプター蛋白質のcDNAについての知見は全くなかった。すなわち、ヒトCRF₂レセプター蛋白質を使用してCRF₂レセプターのアゴニスト／アンタゴニストをスクリーニングすることができれば、実験動物を用いることの欠点（例えば、種が異なることにより、ヒトに対して効果を発揮できない化合物が得られる可能性があることなど）を克服することができ、ヒトに対して有効な医薬の開発が効率よく行えるようになると期待される。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、PCR用のDNAプライマーとして有用な新規DNA、該DNAを用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの増幅方法、該DNAを用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAのスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られるDNAおよびスクリーニング方法で得られたDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを提供するものである。さらに、本発明は、ヒトの中枢神経系や末梢組織などに作用するヒトのCRF₂レセプターアゴニストあるいはアンタゴニストのスクリーニングなどに有用な新規ヒトCRF₂レセプター蛋白質、該蛋白質をコードするDNAおよび該蛋白質の製造法およびその用途を提供するものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、効率よくG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを採取することができれば、その中に新規レセプター蛋白質をコードするDNAが含まれていた場合にそれを遺伝子組み換え技術によって発現させ、今後の研究、医薬品開発に多大な効果を奏することができると考え、鋭意研究を重ねた結果、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域または第7膜貫通領域をコードする塩基配列の類似性に基づいて新規なDNAプライマーを合成することに成功した。そして、これらのDNAプライマーを用いてPCRを行うことによって予想外にもG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）を効率よく増幅することに成功した。すなわち、本発明者らは、該DNAプライマーを用いて各種DNAの増幅、解析を行うことによって新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを得ることができることを見いだした。

【0012】より具体的には、本発明者らは、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域および第7膜貫通領域付近に共通するアミノ酸配列を選び、第3膜貫通領域に共通するアミノ酸配列をコードするDNAプライマー（配列番号：1）、および第7膜貫通領域

付近に共通するアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的なDNAプライマー（配列番号：2）を設計した。これらのDNAプライマーは、これまでに報告されている類似のDNAプライマーとは塩基配列が異なり、新規なDNAプライマーである。特に、PCRにおいて伸長反応が効率的に行うことができるように、プライマーの3'末端部分に多くのレセプター蛋白質において共通している塩基配列を使用している。その他の部分においても塩基配列の類似性を活かし、なるべく多くのレセプター蛋白質のDNAと塩基配列が一致するように混合塩基部分を設定した。そして、本発明者らは、上記したDNAプライマーを用いてヒト胃由来のcDNAをPCRにより増幅することに成功し、その解析を進めた。その結果、本発明者らは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするヒト由来のcDNAを単離し、その部分的な構造を決定することに成功した。そして、このcDNAは、ラットおよびマウスのCRF₂レセプター蛋白質とDNAおよびアミノ酸配列の高い相同性が認められたことから、ヒトの胃で発現機能している新規なCRF₂レセプター蛋白質をコードしているDNAであることを見いだした。これらの知見から、このDNAを用いれば、完全長の翻訳枠を持つcDNAを入手することができ、該レセプター蛋白質を製造することもできる。さらに、該ヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAを適当な手段で発現させることによって得られる該レセプター蛋白質を用いれば、レセプター結合実験または細胞内セカンドメッセンジャーの測定等を指標に、生体内あるいは天然・非天然の化合物から該レセプター蛋白質に対するリガンドをスクリーニングすることができ、さらには、リガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うこともできる。

【0013】より具体的には、本発明者らは、〔図3〕に示すヒト胃由来の新規なcDNA断片をPCR法によって増幅し、プラスミドベクターにサブクローニングした（p h s - A H 1）。その部分配列の解析から、該cDNAが新規レセプター蛋白質をコードしていることが明らかになった。この配列をアミノ酸配列に翻訳したところ〔図3〕、第3、第4、第5、第6および第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認された〔図4〕。また、増幅されたcDNAのサイズも、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域と第7膜貫通領域の間の塩基数と比較して同程度の約0.5 kbであった。G蛋白質共役型レセプター蛋白質はそのアミノ酸配列にある程度の共通性を示し、一つの蛋白質ファミリーを形成している。そこで、本件の新規レセプター蛋白質DNA（p h s - A H 1に含まれるcDNA）によってコードされるアミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行ったところ、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるラットCRF₂レセプター蛋白質（U1623

5)、マウスCRFレセプターB蛋白質(U17858)とそれぞれ96.6%および93.9%の相同性が認められ〔図5〕、本件の新規レセプター蛋白質DNAが、ヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードしていることが判明した。さらにこれを基にPCR法を用いてヒトCRF₂レセプター蛋白質の全長をコードするcDNA断片を取得し、ヒトCRF₂レセプター蛋白質の全アミノ酸配列を明らかにした〔図6および図7〕。

【0014】すなわち、本発明は、(1)配列番号:1または配列番号:2で表わされる塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有することを特徴とするDNA、(2)DNAがG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAのポリメラーゼ・チェーン・リアクションに用いられるDNAプライマーである第(1)項記載のDNA、(3)鋳型となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAと第(1)項記載のDNAを混合してポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行なうことを特徴とする該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅する方法、(4)第(1)項記載のDNAをDNAプライマーとしてポリメラーゼ・チェーン・リアクションに用いることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAライブラリーからG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをスクリーニングする方法、(5)第(4)項記載のスクリーニング方法で得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA、(6)第(5)項記載のDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、

【0015】(7)配列番号:3で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその塩、

(8)配列番号:14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその塩、(9)第

(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、(10)第

(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(11)配列番号:4で表される塩基配列を有する第(10)項記載のDNA、(12)配列番号:15で表される塩基配列を有する第(10)項記載のDNA、(13)第(10)項記載のDNAを含有することを特徴とするベクター、(14)第(13)項記載のベクターを保持する形質転換体、(15)第(14)項記載の形質転換体を培養し、形質転換体の細胞膜にヒトCRF₂レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその塩の製造方法、(16)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂

レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩を用いることを特徴とするCRF₂レセプターを活性化するアゴニストもしくはその塩またはCRF₂レセプターとCRFとの結合を拮抗阻害するアンタゴニストもしくはその塩のスクリーニング方法、(17)(i)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と(ii)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、リガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする方法、(18)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とする、リガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(19)第(16)項もしくは第(17)項記載のスクリーニング方法または第(18)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られるヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはその塩、(20)第(16)項もしくは第(17)項記載のスクリーニング方法または第(18)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られるヒトCRF₂レセプターアンタゴニストまたはその塩、(21)第(19)項記載のヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはその塩を含有することを特徴とする痴呆症、肥満症の予防・治療剤、ストレスに対する適応促進剤、ACTH、 β -エンドルフィン、 β -リボトロピンもしくは α -MSFの分泌促進剤、血圧降下剤、気分や行動の調節剤、胃腸機能の調節剤、自律神経系の調節剤、または下垂体、心血管系、消化管もしくは中枢神経の機能検査薬、(22)第(20)項記載のヒトCRF₂レセプターアンタゴニストまたはその塩を含有することを特徴とするストレスからくる鬱病・不安・頭痛、炎症性疾患、免疫抑制、AIDS、アルツハイマー病、胃腸障害、食欲不振、出血性ストレス、薬物・アルコールの禁断症状、薬物依存症、生殖障害、クッシング病または低血圧症の予防・治療剤、および(23)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体を提供する。

【0016】より具体的には、(24)DNAが、配列番号:1または配列番号:2で表される塩基配列、配列番号:1または配列番号:2で表される塩基配列中の1又は2個以上のヌクレオチドが欠失した塩基配列、配列

番号：1または配列番号：2で表される塩基配列に1または2個以上のヌクレオチドが付加した塩基配列、あるいは配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列中の1または2個以上のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換された塩基配列を有するDNAである第

(1)項記載のDNA、(25)蛋白質が、配列番号：3で表されるアミノ酸配列、配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：3で表されるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(7)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその塩、(26)蛋白質が、配列番号：14で表されるアミノ酸配列、配列番号：14で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：14で表されるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号：14で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその塩、

【0017】(27)標識したリガンドを第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または第

(9)項記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(28)標識したリガンドを第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(29)標識したリガンドを第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトC

RF₂レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(30)標識したリガンドを第(14)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したヒトCRF₂レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(14)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したヒトCRF₂レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該ヒトCRF₂レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(31)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質を活性化する化合物を第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、ヒトCRF₂レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(32)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質を活性化する化合物を第(14)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したヒトCRF₂レセプター蛋白質に接触させた場合と、第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を第(14)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したヒトCRF₂レセプター蛋白質に接触させた場合における、ヒトCRF₂レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0018】(33)第(17)項、第(27)項～第(32)項記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその塩、(34)第(33)項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬組成物、(35)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする第(18)項記載のスクリーニング用キット、(36)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCR

F₂レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする第(18)項記載のスクリーニング用キット、(37)第(18)項、第(35)項または第(36)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩、(38)第(37)項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬組成物、および(39)第(23)項記載の抗体と、第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩とを接触させることを特徴とする第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩の定量法を提供する。

【発明の実施の形態】

【0019】本発明のDNAは、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有するDNAである。すなわち、配列番号：1で表わされる塩基配列は、

5'-CATTAYTKGATSGYGRCCA
ACTWCWNCTGG-3'

〔YはTまたはCを示し、KはGまたはTを示し、SはCまたはGを示し、RはAまたはGを示し、WはAまたはTを示し、NはIを示す。〕である〔図1〕。配列番号：2で表わされる塩基配列は、

5'-GTAGARRAYAGCCACMAMRARN
CCCTGRAA-3'

〔RはAまたはGを示し、YはTまたはCを示し、MはAまたはCを示し、NはIを示す。〕であり、これは5'-TTYCAGGGNYTYKTKGTGGCTR
TYYTCTAC-3'

〔YはTまたはCを示し、NはIを示し、KはGまたはTを示し、RはAまたはGを示す。〕で表わされる塩基配列〔図2〕に相補的な塩基配列である。

【0020】本発明のDNAとしては、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAなどの他に、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列と約70～99.9%の相同性を有する塩基配列を有し、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAと実質的に同質の機能を有するDNAなどが挙げられる。実質的に同質の機能としては、例えばDNAプライマーの結合機能、増幅効率などが挙げられる。実質的に同質とは、DNAプライマーの結合機能やプライマー活性が性質的に同質であることを示す。より具体的には、本発明のDNAとしては、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAなどが挙げられる。また、本発明のDNAとしては、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列中の1または2個以上のヌクレオチドが欠失した塩基配列、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列に1または2個以上のヌクレオチドが付加した塩

基配列、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列中の1または2個以上のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換された塩基配列を有するDNAなども挙げられる。さらに具体的には、本発明のDNAとしては、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAなどの他に、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列中の1または2個以上（好ましくは、2個以上9個以下、より好ましくは2個以上6個以下）のヌクレオチドが欠失したもの、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列に1または2個以上（好ましくは、2個以上9個以下、より好ましくはDNA2個以上6個以下）のヌクレオチドが付加したもの、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列に1または2個以上（好ましくは、2個以上9個以下、より好ましくはDNA2個以上6個以下）のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換されたものなどが挙げられる。

【0021】配列番号：1および配列番号：2で表される塩基配列は、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、すなわち、ヒトカルシトニンレセプター(X82466)、ヒトパラチロイドホルモンレセプター(X68596)、ヒトグルカゴンレセプター(U03469)、ヒトグルカゴン-ライクポリペプチド-1レセプター(U01156)、ラットセクレチンレセプター(X59132)、ヒトグロースホルモン放出ホルモンレセプター(L01406)、ヒトピチュイタリーアデニレートサイクレース-アクティブトポリペプチドレセプター(D17516)、ラットピチュイタリーアデニレートサイクレース-アクティブトポリペプチドレセプター(Z23279)、ヒトバソアクティブインテスティナルペプチドレセプター(X75299)、ヒトビップ2レセプター(L36566)、ヒトコルチコトロピン放出ファクターレセプター(L23332)、およびラットコルチコトロピン放出ファクター2レセプター(U16253)などの第3および第7膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列に共通して存在する塩基配列である〔図1および図2〕。上記の()内の略語は、GenBank/EMBL Data Bankにデータとして登録される際の整理番号であり、通常Accession Numberと呼ばれているものである。

【0022】本発明のDNAは、それ自体公知のDNA合成法あるいはそれに準じる方法に従って、製造することができる。たとえば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。公知の合成法としてはたとえば、以下の①～③に記載された方法が挙げられる。

- ①池原森男他、核酸有機化学、化学同人(1979年)
- ②G. H. BlackburnおよびM. J. Gait, Nucleic Acids in Chemistry and Biology, IRL Press, Oxford(1989年)
- ③大塚栄子および井上英夫、日本臨床、47巻、87頁(19

89年)

また、市販のDNA自動合成機を用いることもできる。本発明のDNAのうち、配列番号：1で表わされる塩基配列を有するDNAは前述の公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列に共通して存在する塩基配列であり、また配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAは第7膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列に共通して存在する塩基配列に相補的な塩基配列であるので、該公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（ゲノムDNA、cDNA）またはRNAに相補的に結合することができる。さらに、これらの公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA・RNAに限らず、本発明のDNAの塩基配列に類似した塩基配列を有する他の公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAまたはRNAや未知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAまたはRNAにも相補的に結合することができる。したがって、本発明のDNAはPCR用のDNAプライマーとして用いることができる。例えば、鋳型となる微量のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）と本発明のDNAプライマーを混合してPCRを行なうことによって、該レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）を増幅することができる。具体的には、配列番号：1で表わされる塩基配列を有するDNAプライマーを用いてPCR法を行なうと、該DNAプライマーは鋳型となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）あるいはRNAの第3膜貫通領域に相当する塩基配列に結合し、5'側から3'側へDNAを伸長していく。一方、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAプライマーを用いてPCR法を行なうと、該DNAプライマーは鋳型となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）あるいはRNAの第7膜貫通領域に相当する塩基配列に結合し、3'側から5'側へDNAを伸長していく。すなわち、本発明の配列番号：1で表わされる塩基配列を有するDNAプライマーおよび配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAプライマーを用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域から第7膜貫通領域部分をコードするDNA（断片）を増幅することができる。

【0023】この増幅方法は、公知のPCR法に従って実施することができる。例えば、Saiki R. K. et al. Science, 239:487-491 (1988)に記載の方法に従って実施することができる。PCR法の温度、時間、バッファー、サイクル数、DNAポリメラーゼなどの酵素、2'-deoxy-7-deaza-guanosine triphosphateやInosineの添加などは対象DNAの種類などに応じて適宜選択することができる。またRNAを鋳型として用いる場合は、Saiki R. K. et al. Science, 239:487-491 (1988)に記載の方法な

どに従って行なう。さらに、本発明のDNAは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域または第7膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列に相補的に結合することができるので、ある種のDNAライブラリーからG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）をスクリーニングするためのプローブとしても有用である。本発明のDNAをプローブとして用いてDNAライブラリーからG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）をスクリーニングするには、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。特に、本発明のDNAをPCR法のDNAプライマーとして使用すれば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）の増幅とスクリーニングとを一挙に行なうことができる。すなわち、本発明のDNAをPCR用のDNAプライマーとして使用すれば、該DNAプライマーはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域から第7膜貫通領域のアミノ酸配列をコードするDNA（断片）あるいはRNAに結合し、該DNAを増幅していくことができるので、本発明のDNAプライマーはDNAライブラリーの中からG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域から第7膜貫通領域のアミノ酸配列をコードするDNA（断片）のみを選択的に増幅することができる。そして、増幅されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域から第7膜貫通領域部分のアミノ酸配列をコードするDNA（断片）をプローブとして用い、それ自体公知の方法に従って、DNAライブラリーからG蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAをスクリーニングすることができる。

【0024】すなわち、本発明は、本発明のDNAをPCR用DNAプライマーとして用いることを特徴とするレセプター蛋白質をコードするDNA（断片）を含有するDNAライブラリーあるいは組織・細胞由来のRNAからG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）をスクリーニングする方法を提供する。具体的には、本発明は、本発明のDNAをPCR用のDNAプライマーとして用い、該DNAプライマーと鋳型となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）を含有するDNAライブラリーとを混合しPCR法を行ない、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域から第7膜貫通領域部分をコードするDNAを増幅し選択し（すなわち、スクリーニングし）、これをプローブとして自体公知の方法を用いて、DNAライブラリーから完全な長さを持つG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをクローニングする方法を提供する。クローニングされたDNAの解析はDNAシーケンサーを用いて行なうことができる。本発明のDNAを用いるPCR法による増幅およびスクリーニングの対象となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコード

するDNA（断片）またはRNAとしては、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）またはRNAであってもよいし、新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）またはRNAであってもよい。例えば、脊椎動物（例えば、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ、サル、ヒトなど）のあらゆる組織（例えば、下垂体、脳、脾臓、肺、副腎など）、昆虫もしくはその他の無脊椎動物（例えば、ショウジョウバエ、カイコ、ヨトウガなど）、植物（例えば、イネ、コムギ、トマトなど）およびそれらに由来する培養細胞株由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）またはRNAなどが挙げられる。具体的には、例えばカルシトニン、パラチロイドホルモン（PTH）、グルカゴン、グルカゴン-ライクポリペプチド-1、セクレチン、グロースホルモン放出ホルモン（GHRH）、PACAP、VIP、VIP2、CRFなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）またはRNAなどが挙げられる。本発明のDNAを用いたPCR法による増幅の鋳型とするDNA（断片）としては、上記の組織・細胞由来のものであればいかなるものであってもよい。より具体的には、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、組織・細胞由来のcDNA、組織・細胞由来のcDNAライブラリーのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりmRNA画分を調整したものを用いて直接にRT-PCR法によって増幅することもできる。鋳型となるDNAは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAであってもよいし、そのDNA断片であってもよい。本明細書では、これらをまとめてDNA（断片）と表記する場合がある。

【0025】DNAのクローニングの手段としては、該DNAの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または該DNAの一部あるいは全領域を有するDNAもしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989 に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なう。したがって、本発明のDNAを用いるスクリーニング方法で得られるDNA（断片）は、DNAライブラリーなどに含まれているG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）である。すなわち、具体的には、カルシトニン、PTH、グルカゴン、グルカゴン-ライクポリペプチド-1、セクレチン、GHRH、PACAP、VIP、VIP2、CRFなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）であ

る。該スクリーニング方法で得られたDNA（断片）をプローブとして用いることによって、適当なDNAライブラリーからそれ自体公知のDNAのスクリーニング方法に従って、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAを単離することができる。

【0026】G蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有してよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。また、該DNAをプローブとしてノザンプロービングを行なって、該レセプター蛋白質が発現している組織・細胞などを決定することができる。また、全コード領域を有するDNAを適当なプロモーターと連結して動物細胞に導入することによりレセプター蛋白質を発現させることができる。本発明のスクリーニング方法で得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、具体的には、カルシトニン、PTH、グルカゴン、グルカゴン-ライクポリペプチド-1、セクレチン、GHRH、PACAP、VIP、VIP2、CRFなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質である。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質は、温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

【0027】該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。具体的には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分ペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。さらに、個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分ペプチドでもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に

記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質を精製単離することができる。上記方法で得られる蛋白質が遊離体である場合は、公知の方法によって適用な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。さらに、該部分ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

【0028】本発明のDNAを用いた前述のスクリーニング方法で得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA(断片)および該DNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質または部分ペプチドは、例えば、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定や該レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニングなどに使用することができる。この場合、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA(断片)の発現系を構築する。宿主として用いるものは動物細胞、昆虫細胞、酵母、枯草菌、大腸菌などいずれでも良く、用いるプロモーターとしては遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものであっても良い。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。構築した発現細胞をそのまま、あるいはそれらより公知の方法に従って膜画分を調製し、結合実験に供することができる。用いるリガンドは、市販の放射性同位元素等による標識化合物、また培養上清、組織抽出物等を直接クロラミンT法やラクトペルオキシダーゼ法によって標識化したものでもよい。結合・遊離のリガンドの分離は、基質に接着している細胞を用いた場合はそのまま洗

浄によって行い、浮遊細胞あるいは膜画分の場合は遠心分離あるいはろ過によって行っても良い。容器等への非特異結合は、投入した標識リガンドに対して100倍程度の濃い非標識リガンドの添加によって推定できる。

【0029】このような結合実験によって得られたリガンドについて、アゴニスト・アンタゴニストの判別を行なうことができる。具体的には、該レセプター蛋白質を発現している細胞とリガンドであることが予想される天然物・化合物をインキュベートし、その後培養上清を回収あるいは細胞を抽出する。これらに含まれる成分の変化を、例えば市販の測定キット(cAMP、ジアシルグリセロール、cGMP、プロテインキナーゼAなど)で測定する。また公知の方法に従い、Fura-2、³Hアラキドン酸、³Hイノシトールリン酸代謝物の遊離等を測定することもできる。このようにスクリーニングして得た化合物、天然物は該レセプター蛋白質に対するアゴニストあるいはアンタゴニストであり、該レセプターが分布する組織・細胞に作用することが予測される。そのため、ノーザンブロッティング等によって明らかにした分布を参考にすることによって、よりその薬効を効率的に探索することが可能である。また、例えば中枢神経組織、循環系、腎臓、膵臓等において、新しい薬効を持つ化合物が望まれる。組織より選択的にG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅することによって、これらを用いてより効率的に医薬の開発を進めることができる。

【0030】以下に、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAのスクリーニング方法で得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA(断片)および該DNAを発現させて得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩(以下、塩を含めてG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドと略称する)の有用性について、以下に詳細に説明する。

(1) G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法

G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを探索または決定するための試薬として有用である。すなわち、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドと、試験化合物とを接触させることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。試験化合物としては、公知のリガンド(例えば、アンギオテンシン、ボンベシ、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP(バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニン

ジーンリレーティッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタノイド、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine (IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、カルシトニン、パラチロイドホルモン、グルカゴン、セクレチン、GHRH、PACAP、CRFなど)の他に、例えば温血動物(例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトなど)の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などをG蛋白質共役型レセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

【0031】具体的には、該リガンド決定方法は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを用いるか、または組み替え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進する活性または抑制する活性)を有する化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を決定する方法である。該リガンド決定方法においては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質または部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

【0032】より具体的には、

①標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養す

ることによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定しすることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

④試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0033】リガンド決定方法の具体的な説明を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(nuclear polyhedrosis virus; NPV)のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献[Nambi, P. ら、ザ・ジ

ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年]に記載の方法に従って行うことができる。

【0034】したがって、リガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであつてもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。リガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^3 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0035】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の①~③の方法を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識した試験化合物が必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識した試験化合物としては、 $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、

$[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシ、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP (バソアクティブ インテスティナルアンド リレイトッド ペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン (D5ドーパミンなど)、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタノイド、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine (IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、カルシトニン、パラチロイドホルモン、グルカゴン、セクレチン、GHRH、PACAP、CRFなどが好適である。

【0036】具体的には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドの決定方法を行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10 (望ましくはpH6~8) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80 (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSEF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量 (5000cpm~500000cpm) の $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB)を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは γ -カウンターで計測する。全結合 (B) からNSBを引いたカウント (B-NSB) が0cpmを越える試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。

【0037】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の④～⑤の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0038】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドの決定方法に用いるキットとしては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチド、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものなどが挙げられる。リガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。孔径 $0.45\mu m$ のフィルターで濾過滅菌し、 $4^{\circ}C$ で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、 $37^{\circ}C$ 、5% CO_2 95%airで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの水溶液の状態のものを $4^{\circ}C$ あるいは $-20^{\circ}C$ にて保存し、用時に測定用緩衝液にて $1\mu M$ に希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物を同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

【0039】2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、 $490\mu l$ の測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を $5\mu l$ に加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を $5\mu l$ 加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合することができるリガンドとしては、例えば脳、下垂体などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的にはアングiotenシン、ボンベシ、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP（バソアクティブ インテスティナル アン ド リレイテッド ペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン（D5ドーパミンなど）、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレティッドペプチド）、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタノイド、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine（IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、カルシトニン、パラチロイドホルモン、グルカゴン、セクレチン、GHRH、PACAP、CRFなどが挙げられる。

【0040】（2）G蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記（1）の方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤として低毒性で安全に使用することができる。例えば、生体内においてG蛋白質共役型レセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、（イ）G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）脳細胞などにG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該脳細胞を該患者に移植

することなどによって、該患者の脳細胞におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。したがって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性なG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。

【0041】G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0042】また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールな

ど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。該DNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは1.0～50mg、より好ましくは1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形で通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは0.1～20mg程度、より好ましくは0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0043】（3）G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、リガンドに対して結合性を有しているため、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。この定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体をG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドと接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）

【0044】（4）G蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法
G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆるG蛋白質共役型レセプ

ターアゴニスト)と該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆるG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト)などが含まれる。すなわち、(i)①G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または部分ペプチドもしくはその塩および②リガンドを接触させた場合と(ii)①G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または部分ペプチドもしくはその塩、②リガンドおよび③試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法においては、

(i)①G蛋白質共役型レセプター蛋白質または部分ペプチドおよび②リガンドを接触させた場合と(ii)①G蛋白質共役型レセプター蛋白質または部分ペプチド、②リガンドおよび③試験化合物を接触させた場合における、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

【0045】より具体的には、

①標識したリガンドを、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに接触させた場合における、標識リガンドの該蛋白質またはその部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識リガンドを、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識リガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識リガンドを、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識リガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④G蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物

(例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど)を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤G蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物(例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど)を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0046】このスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。まず、本発明のスクリーニング方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、温血動物の臓器の膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現

させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。したがって、スクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

【0047】スクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0048】リガンドとG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物をスクリーニングする前記の①~③を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識したリガンドが必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識されたリガンドなどを利用することができる。具体的には、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10 (望ましくはpH6~8) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドXとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量 (5000cpm~50000cpm) の標識したリガンドを添加し、同時に $10^{-4}M \sim 10^{-10}M$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B₀)からNSBを引いたカウント(B₀-NSB)を100%とした時、特異的結合量(B-NSB)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0049】リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物スクリーニングする前記の④~⑤の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、

c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性などを公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を有する細胞株（例えば、マウス脾臓β細胞株MIN6など）、前述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質発現細胞株などが望ましい。試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0050】リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチド、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものである。スクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10⁵個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したものの。

③標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などで標識したリガンド

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存

し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0051】2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

②10⁻³~10⁻¹⁰Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識リガンドを5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに10⁻³Mのリガンドを5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

【0052】

【数1】

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

【0053】PMB: Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ : 最大結合量

スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドとG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物であり、具体的にはG蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩 (いわゆるG蛋白質共役型レセプターアゴニスト)、あるいは該刺激活性を有しない化合物 (いわゆるG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト) である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0054】該G蛋白質共役型レセプターアゴニスト

は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物として有用である。逆に、G蛋白質共役型レセプターアンタゴニストは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実

施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0055】錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは1.0～50mg、より好ましくは1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象

臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは0.1～20mg程度、より好ましくは0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0056】（5）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体または抗血清の製造

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体または抗血清は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩を抗原として用い、自体公知の抗体の製造法に従って製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

【0057】〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩（以下、G蛋白質共役型レセプターと略称する場合がある）は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、たとえばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化G蛋白質共役型レセプターと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256、495（1975）〕に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/O、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いら

れる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000~PEG6000）が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗G蛋白質共役型レセプター抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、たとえばG蛋白質共役型レセプター抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したG蛋白質共役型レセプターを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗G蛋白質共役型レセプター抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0058】（b）モノクローナル抗体の精製

抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行われる。以上の（1）および（2）の方法に従って製造させる本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体は、G蛋白質共役型レセプターを特異的に認識することができるので、被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量、特にサンドイ

ッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

【0059】（i）本発明のG蛋白質共役型レセプターに反応する抗体と、被検液および標識化G蛋白質共役型レセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化G蛋白質共役型レセプターの割合を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法、（ii）被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法において、一方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのN端部を認識する抗体で、他方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのC端部に反応する抗体であることを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法を提供する。本発明のG蛋白質共役型レセプターを認識するモノクローナル抗体（以下、抗G蛋白質共役型レセプター抗体と称する場合がある）を用いてG蛋白質共役型レセプターの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えばG蛋白質共役型レセプター量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

【0060】標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴Cなどが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えばβ-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の

合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した抗G蛋白質共役型レセプター抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗G蛋白質共役型レセプター抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のG蛋白質共役型レセプター量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

【0061】本発明のサンドイッチ法によるG蛋白質共役型レセプターの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗G蛋白質共役型レセプター抗体はG蛋白質共役型レセプターの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、G蛋白質共役型レセプターのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通

常の技術的配慮を加えてG蛋白質共役型レセプターの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる【例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。以上のように、本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体を用いることによって、G蛋白質共役型レセプターを感度良く定量することができる。

【0062】本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質としては、配列番号: 3または配列番号: 14で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質などの他に、配列番号: 3または配列番号: 14で表されるアミノ酸配列と約97~99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号: 3または配列番号: 14で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。より具体的には、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質としては、配列番号: 3または配列番号: 14で表されるアミノ酸配列を有するヒト胃由来のCRF₂レセプター蛋白質などが挙げられる。また、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質としては、配列番号: 3または配列番号: 14で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号: 3または配列番号: 14で表されるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を含有する蛋白質なども挙げられる。さらに具体的には、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質としては、配列番号: 3または配列番号: 14で表されるアミノ酸配列を有するヒト胃由来のCRF₂レセプター蛋白質などの他に、配列番号: 3または配列番号: 14で表されるアミノ酸配列中の1または2

個以上（好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下）のアミノ酸が欠失したもの、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下）のアミノ酸が付加したもの、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものなどが挙げられる。さらに、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₆アシル基など）で保護されているもの、GluのN末端側が生体内で切断され、該Gluがピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

【0063】本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその塩は、後述するヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。具体的には、〔図4〕または〔図8〕で示される本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0064】本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の

部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis)、Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide)、Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質を精製単離することができる。上記方法で得られる蛋白質が遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0065】本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、本発明の配列番号：3または配列番号：14のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ヒトゲノムDNA、ヒトゲノムDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、ヒト組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する。)によって増幅することもできる。RT-PCRは、より具体的には、DNAプライマーとしては、配列番号：4または配列番号：15で表わされる塩基配列（センス配列またはアンチセンス配列）を有する合成DNAなどが用いられる。

【0066】本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、ヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分塩基配列を有

10

20

30

40

50

する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAをヒトヒトCRF₂レセプター蛋白質の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd (ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。クローン化されたヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。ヒトCRF₂レセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0067】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC118, pUC119)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trp プロモーター、lac プロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lpp プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどがそれぞれ利用できる。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ヒトCRF₂レセプター蛋白質のN末端側に付加することもできる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル

配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクターα・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

【0068】このようにして構築されたヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌、バチルス属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン (Gene), 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。酵母としては、たとえばサッカロマイセスセレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero細胞, チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr⁻CHO細胞), CHO K-1細胞, ヒトFL細胞, 293細胞, L細胞, ミエロマ細胞, C127細胞, Balb/c 3T3細胞, Sp-2/O細胞などが用いられる。

【0069】エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・ア

ンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行われる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。昆虫細胞を形質転換するには、たとえばバイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。以上の宿主細胞の中でも、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質DNAを含有する発現プラスミドの宿主細胞としては、特に、動物細胞などが好ましく、例えば293細胞、CHO細胞、Vero細胞、L細胞、ミエローマ細胞、C127細胞、Balb/c3T3細胞、Sp-2/O細胞などが挙げられ、なかでもCHO細胞または293細胞などが好ましく、特にCHO細胞〔ジャーナル・オブ・エクスペリメント・オブ・メディシン (J. Exp. Med.), 108巻, 945(1958)〕などが好適である。さらに、CHO細胞のなかでも、dhfr遺伝子が欠損しているCHO細胞(以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略称する場合がある)〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4216-4220(1980)〕、CHO K-1細胞〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 1275(1968)〕などが好ましい。発現プラスミド中に選択マーカーとしてdhfr遺伝子が挿入されている場合は、CHO(dhfr⁻)細胞などが好適である。発現プラスミドの動物細胞への導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法〔Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー(Virology)52, 456-467(1973)〕、電気穿孔法〔Neumann, E. et al. エンボ・ジャーナル(EMBO J.) 1, 841-845(1982)〕等が用いられる。以上のようにしてヒトCRF₂レセプター蛋白質DNAを含有するベクターで形質転換された形質転換体を得られる。また、ヒトCRF₂レセプター蛋白質DNAを含有する発現プラスミドで形質転換された形質転換体は、ヒトCRF₂レセプター蛋白質を製造することができる。

【0070】ヒトCRF₂レセプター蛋白質を高発現できる細胞は、前述の発現プラスミドが染色体に組込まれた細胞をクローン選択によって選択することによって得ることができる。具体的には、まず、上記の選択マーカーを指標として形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた形質転換体に対し

て、繰り返しクローン選択を行うことによりヒトCRF₂レセプター蛋白質の高発現能を安定に有する細胞株を得ることができる。またdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、メソトレキセート(MTX)の濃度を漸次上げて培養して耐性細胞を選択することにより、導入遺伝子を細胞内で増幅することにより、さらに高発現の細胞株を得ることもできる。本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質および本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質DNAを含有するベクター(特に、発現プラスミド)を含有する形質転換体を、ヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAの発現が可能な条件下で培養することによっても製造することができる。宿主細胞がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主細胞がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー(Burkholder)最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)〕が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培

養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主細胞が昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)] に非働化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約0.5～20%の胎児牛血清を含むEMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)], α -MEM培地などが用いられる。特に、CHO (dhfr⁻) 細胞およびdhfr選択マーカー遺伝子を用いる場合、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～72時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌などを加える。このようにして、ヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクター (特に、発現プラスミド) を保持する形質転換体からヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞を製造することができる。

【0071】上記したヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞の培養物からヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。まず、ヒトCRF₂レセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりヒトCRF₂レセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100 (登録商標。以下、TMと省略することがある。) などの界面活性剤が含まれていてもよい。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速

液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。かくして得られるヒトCRF₂レセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するヒトCRF₂レセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成するヒトCRF₂レセプター蛋白質の活性は標識したCRFなどとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0072】本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞の細胞膜画分は、上記のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、例えば、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば細胞破碎液を低速 (500rpm～3000rpm) で短時間 (通常、約1分～10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm～30000rpm) で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したヒトCRF₂レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞やその細胞膜画分中のヒトCRF₂レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり10³～10⁶分子であるのが好ましく、10⁵～10⁷分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質、ヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分ペプチドおよびヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAは、①抗体および抗血清の入手、②組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、③同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、④構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデ

ザインの実施、⑤遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作製、⑥遺伝子治療などに用いることができる。特に、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、温血動物（特に、ヒト）に特異的なCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストをCRFに起因する各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

【0073】以下に、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質、ヒトCRF₂レセプター蛋白質部分ペプチド、ヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAの用途について、具体的に説明する。

(1) CRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法

CRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法においては、ヒトCRF₂レセプター蛋白質としてヒトの心臓や筋肉を用いることも考えられる。しかし、ヒト由来の組織は入手が極めて困難であるため、スクリーニングに用いるものとしては適当ではなく、実際には、細胞（特に、CHO細胞などの動物細胞や昆虫細胞）に大量発現させた組換え型ヒトCRF₂レセプター蛋白質が適している。さらには、ヒトCRF₂レセプター蛋白質を持続的に安定発現している細胞株を用いるのが最も好ましい。したがって、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩、または本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分は、CRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩、または本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いることを特徴とするCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

【0074】より具体的には、本発明は、

(I) (i) 本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に、CRFを接触させた場合と (ii) 本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に、CRFおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、および

(II) (i) 本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に、CRFを接触させた場合と (ii) 本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に、CRFおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを

特徴とするCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

具体的には、本発明のスクリーニング方法 (I) および (II) においては、(i) と (ii) の場合における、例えば該ヒトCRF₂レセプター蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩、またはヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に対するCRFの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とするものである。

【0075】より具体的には、本発明は、

(I a) (i) 標識したCRFを、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合と、(ii) 標識したCRFおよび試験化合物を、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合における、標識したCRFの該レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法

(II a) (i) 標識したCRFを、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したCRFおよび試験化合物を、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に接触させた場合における、標識したCRFの該細胞またはその細胞膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、および

(II b) (i) CRFを、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に接触させた場合と、(ii) CRFおよび試験化合物を、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に接触させた場合における、ヒトCRF₂レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、K⁺チャンネルの開放、N型Ca²⁺チャンネルの閉鎖、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺濃度の変動、細胞内cAMP生成の促進または抑制、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、細胞の遊走活性、ホルモンの分泌、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

【0076】上記の (I a) または (II a) のスクリーニング方法において、ヒトCRF₂レセプター蛋白質に結合して、CRFとヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物がヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストとして選択できる。さらに、上記 (II b) のスクリーニング方法において、ヒトCR

F₂レセプターに結合し、該レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、K⁺チャンネルの開放、N型Ca²⁺チャンネルの閉鎖、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺濃度の変動、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成の促進または抑制、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、細胞の遊走活性、ホルモン分泌、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物をヒトCRF₂レセプターアゴニストとして選択することができる。一方、上記の(Ia)または(IIa)のスクリーニング方法において、CRFとヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する活性が認められた試験化合物の中で、該細胞刺激活性を有しない化合物をヒトCRF₂レセプターアンタゴニストとして選択することができる。本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAおよびヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞が得られる以前は、ヒトCRF₂レセプター蛋白質を高発現できる細胞がなかったため、ヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストを効率よくスクリーニングすることができなかった。

【0077】本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。リガンドとして使用するCRFとしては、市販のものなどを用いることができる。また、CRFの代わりに、公知のCRFレセプターアゴニストやアンタゴニストなどを使用することもできる。例えば、ソイベジンやウロテンシンIなどを使用することができる。標識したCRFとしては、例えば、[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]などで標識したCRFなどを用いることができ、さらには、[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]などで標識した公知のCRFアゴニストやアンタゴニストなどを用いることもできる。例えば、[¹²⁵I]で標識されたヒツジCRF（NEN Research Products社、NEX-217）やヒトCRF（NEN Research Products社、NEX-216）などが好適である。試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0078】具体的には、上記の(Ia)または(IIa)のスクリーニング方法を実施するには、まず、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分、あるいはヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを、スクリーニングに適した反応バッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。反応バッファーには、pH約4~10（望ましくは、pH約6~8）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどの、CRFとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、T

ween-80™（花王アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的で、PMSF、ロイペプチン、パシトラシン、アプロチニン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。さらに、蛋白質成分として、約0.01~5%（好ましくは、0.1~1%）のBSA、約0.01~5%（好ましくは、0.05~0.5%）のゼラチンなどを加えることもできる。従来、CRFは41個のアミノ酸からなる比較的分子量の大きいペプチドであるため、リガンド結合実験の際の反応容器やピペットなどに吸着しやすく、正確で感度の高い測定は容易ではなかった。そこで、本発明の上記(Ia)および(IIa)のスクリーニング方法において、CRFの特異的結合量を測定するための反応条件としては、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質またはその部分ペプチド、あるいは本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分にCRFを接触させる際の反応バッファーの組成、反応時間、反応温度などをそれぞれ適切に設定することが望ましい。

【0079】反応バッファーの組成中に非特異的結合を低減させる目的で、界面活性剤や蛋白質を添加することが効果的で、特に界面活性剤としては、例えば約0.01~0.05%のCHAPS、約0.05%のジギトニンを添加することが望ましい。また、蛋白質成分としては、例えば、約0.2%のBSAまたは約0.3%のゼラチンを添加することが望ましい。また、反応温度と反応時間としては、それぞれ約25℃、約2時間であることが望ましい。一方、上記スクリーニング方法にヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有するCHO細胞を用いる場合、培養器に付着させたまま、つまりCHO細胞を生育させた状態で、あるいはグルタルアルデヒドやパラホルムアルデヒドで固定化した細胞を用いて、CRFとCRF₂レセプター蛋白質を結合させることができる。この場合、該反応バッファーとしては、例えば培地やハンクス液などが用いられる。そして、0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量（例えば、2200Ci/mmolの場合、約10000cpm~100000cpm）の標識したCRF（例えば、[¹²⁵I]CRF）を添加し、同時に10⁻⁴M~10⁻¹⁰Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のCRFを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の洗浄用バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性（例えば、[¹²⁵I]の量）を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで測定する。濾過には、マニホールドやセルハーベスターを用い

ることができるが、セルハーベスターを用いることが大量の試験化合物を処理するためには望ましい。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント($B_0 - \text{NSB}$)を100%とした時、試験化合物を入れた時の特異的結合量($B - \text{NSB}$)が、例えばカウント($B_0 - \text{NSB}$)の50%以下になる試験化合物をアゴニストまたはアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

【0080】また、上記(IIb)のスクリーニング方法を実施するためには、ヒトCRF₂レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺濃度の変動、細胞内cAMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、ホルモンの放出、細胞の遊走活性などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、ヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有するCHO細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、cAMPやアラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。

【0081】本発明のスクリーニング用キットは、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有するCHO細胞またはその細胞膜画分、あるいは本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

〔スクリーニング用試薬〕

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②ヒトCRF₂レセプター蛋白質標品

ヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有するCHO細胞を、12穴プレートに5×10⁵個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識CRF

市販の[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識したCRF

溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて5nMに希釈する。

④CRF標準液

CRFを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで0.1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0082】〔測定法〕

①12穴組織培養用プレートにて培養したヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有するCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

②10⁻³~10⁻¹⁰Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、5nM標識CRFを5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに10⁻⁴MのCRFを5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識CRFを0.5mlの0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding(PMB)を次の式〔数2〕で求める。なお、

[¹²⁵I]で標識されている場合は、液体シンチレーターと混合することなしに直接ガンマカウンターで測定できる。

【0083】

〔数2〕

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

【0084】PMB: Percent Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀: 最大結合量

⑤本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、CRFと本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物であり、具体的には、ヒトCRF₂レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩(いわゆる、ヒトCRF₂レセプターアゴニスト)、あるいは該細胞刺激活性を有しない化合物またはその塩(いわゆる、ヒトCRF₂レセプターアンタゴニスト)である。

【0085】ヒトCRF₂レセプターアゴニストは、CRFが有する生理活性の全部または一部を有しているので、該生理活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物として有用である。例えば、痴呆症、肥満症の予防・治療剤として有用である他、例えば、ストレスに対する適応促進剤、ACTH、β-エンドルフィン、β-リポトロピンもしくはα-MSFの分泌促進剤、血圧降下剤、気分や行動の調節剤、胃腸機能の調節剤、自律神経系の調節剤、下垂体、心血管系、消化管もしくは中枢神経の機能検査薬などとして有用である。一方、ヒトCRF₂レセプターアンタゴニストは、CRFが有する生理活性の全部または一部を抑制することができるので、該生理活性

を抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。例えば、ストレスからくる鬱病・不安・頭痛、炎症性疾患、免疫抑制、AIDS、アルツハイマー病、胃腸障害、食欲不振、出血性ストレス、薬物・アルコール等の禁断症状、薬物依存症、生殖障害、クッシング病、低血圧症の予防・治療剤などとして有用である。さらに、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られた該ヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストの構造式を化学修飾あるいは置換したもの、また、該化合物の構造式を基にデザイン化した化合物なども、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られたヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストに含まれる。該ヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機塩（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0086】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるアゴニストまたはアンタゴニストを上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って低毒性で安全に使用することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムの様な結合剤、結晶性セルロースの様な賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などの様な膨化剤、ステアリン酸マグネシウムの様な潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンの様な甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーなどの様な香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂の様な液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水の様なベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などの様な天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0087】注射用の水溶液としては、例えば生理食塩

水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど、特にヒト）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0088】（2）CRF₂レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤

本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAは、CRF₂レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤として使用することができる。例えば、生体内において本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質が減少しているためにCRFの生理作用が期待できない患者がいる場合に、（イ）本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し、生体内で該ヒトCRF₂レセプター蛋白質を発現させることによって、あるいは（ロ）細胞に本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し、該ヒトCRF₂レセプター蛋白質を発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、該患者のヒトCRF₂レセプター蛋白質の量を増加させ、CRFの作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性なCRF₂レセプター蛋白質欠乏症（例えば、高血圧、

自律神経失調症またはストレスなど)の予防・治療剤などとして用いることができる。本発明のDNAを上記の予防・治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0089】錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール(たとえばエタノール)、ポリアルコール(たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(たとえばポリソルベート80(TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど、特

にヒト)に対して投与することができる。該DNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。また、本発明のDNAを細胞に挿入し、該ヒトCRF₂レセプター蛋白質を発現させ、該細胞を患者に移植する方法は、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法を用いることができる。

【0090】(3) CRFの定量法

本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドまたはその塩は、CRFに対して結合性を有しているので、生体内におけるCRF濃度を感度良く定量する際の試薬として用いることができる。すなわち、本発明は、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドまたはその塩と、被検体とを接触させることを特徴とする被検体中のCRF濃度の定量法を提供する。本発明の定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

さらに、本発明のCRFの定量法は、CRF濃度の増減に起因する疾病(例えば、ストレス、炎症、アルツハイマー病、胃腸障害など)の診断方法としても使用できる。

【0091】(4) 本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体または抗血清の製造

本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体(例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体)または抗血清は、本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

【0092】〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩（以下、ヒトCRF₂レセプターと略称する場合がある）は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、たとえばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化ヒトCRF₂レセプターと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256、495（1975）〕に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗ヒトCRF₂レセプター抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、たとえばヒトCRF₂レセプター抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗ヒトCRF₂レセプターモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したヒトCRF₂レセプターを加え、固相に

結合した抗ヒトCRF₂レセプターモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗ヒトCRF₂レセプターモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗ヒトCRF₂レセプター抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0093】(b) モノクローナル抗体の精製

抗ヒトCRF₂レセプターモノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行われる。以上の（1）および（2）の方法に従って製造させる本発明のヒトCRF₂レセプター抗体は、ヒトCRF₂レセプターを特異的に認識することができるので、被検液中のヒトCRF₂レセプターの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、(i) 本発明のヒトCRF₂レセプターに反応する抗体と、被検液および標識化ヒトCRF₂レセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化ヒトCRF₂レセプターの割合を測定することを特徴とする被検液中のヒトCRF₂レセプターの定量法、(ii) 被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のヒトCRF₂レセプターの定量法において、一方の抗体がヒトCRF₂レセプターのN端部を認識する抗体で、他方の抗体がヒトCRF₂レセプターのC端部に反応する抗体であることを特徴とする被検液中のヒトCRF₂レセプターの定量法を提供する。本発明のヒトCRF₂レセプターを認識するモノクローナル抗体（以下、抗ヒトCRF₂レセプター抗体と称する場合がある）を用いてヒトCRF₂レセプターの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよ

く、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えばヒト CRF_2 レセプター量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

【0094】標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンインソチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した抗ヒト CRF_2 レセプター抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗ヒト CRF_2 レセプター抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のヒト CRF_2 レセプター量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

【0095】本発明のサンドイッチ法によるヒト CRF_2 レセプターの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗ヒト CRF_2 レセプター抗体はヒト CRF_2 レセプターの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、ヒ

ト CRF_2 レセプターのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。本発明のヒト CRF_2 レセプター抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0096】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてヒト CRF_2 レセプターの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる【例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunoc hemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunoc hemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunoc hemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunoc hemical Techniques(Part D:Selected Immunoassay s))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques (Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照】。

以上のように、本発明のヒトCRF₂レセプター抗体を用いることによって、ヒトCRF₂レセプターを感度良く定量することができる。

【0097】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
EIA	: エンザイムイムノアッセイ
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基

Ph : フェニル基
TC : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

【0098】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：2〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質の全長をコードするcDNA断片の塩基配列を示す。

後述の実施例4で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/phs-AH1

は、平成7年6月15日から通商産業省工業技術院生命

工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-5136 として寄託されており、また平成 7 年 6 月 12 日から財団法人発酵研究所 (IFO) に IFO 15827 として寄託されている。また、後述の実施例 6 で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/pCRF2-10 は、平成 7 年 9 月 5 日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-5226 として寄託されており、また平成 7 年 8 月 29 日から財団法人発酵研究所 (IFO) に IFO 15868 として寄託されている。

【0099】

【実施例】以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例 1】G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする DNA を増幅させるための合成 DNA プライマーの製造

公知のヒトカルシトニンレセプター (X82466)、ヒトパラチロイドホルモンレセプター (X68596)、ヒトグルカゴンレセプター (U03469)、ヒトグルカゴン-ライクポリペプチド-1 レセプター (U01156)、ラットセクレチンレセプター (X59132)、ヒトグロースホルモン放出ホルモンレセプター (L01406)、ヒトピチュイタリーアデニレートサイクレス-アクティブートポリペプチドレセプター (D17516)、ラットピチュイタリーアデニレートサイクレス-アクティブートポリペプチドレセプター (Z23279)、ヒトパソアクティブインテスティナルペプチドレセプター (X75299)、ヒトビップ 2 レセプター (L36566)、ヒトコルチコトロピン放出ファクターレセプター (L23332)、およびラットコルチコトロピン放出ファクター 2 レセプター (U16253) の第 3 および第 7 膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列をそれぞれ比較し、それぞれの領域で類似性の高い部分を見いだした

〔図 1 および図 2〕。上記の () 内の略語は DNASIS Gene/Protein シークエンスデータベース (CD019、日立ソフトウエアエンジニアリング) を用いて GenBank/EMBL Data Bank を検索した際に示される整理番号であり、通常 Accession number と呼ばれるものである。特に、多くのレセプター蛋白質をコードする cDNA で一致する塩基部分を基準とし、その他の部分においてもなるべく多くのレセプター cDNA と配列の一致性を高めるために混合塩基の導入を計画した。この配列をもとに、共通する塩基配列に相補的である配列番号：1 または配列番号：2 で表わされる塩基配列を有する合成 DNA 2 本を作製した。

5'-CATTAYTKGATSGYGRCCAAC
TWCWNCTGG-3'

〔Y は T または C を示し、K は G または T を示し、S は C または G を示し、R は A または G を示し、W は A または T を示し、N は I を示す。〕 (配列番号：1)

5'-GTAGARRAYAGCCACMAMRARN
CCCTGRAA-3'

〔R は A または G を示し、Y は T または C を示し、M は A または C を示し、N は I を示す。〕 (配列番号：2)
Y、K、S、R、W および M は、合成時に複数の塩基に混合して合成する。

10 【0100】

【実施例 2】ヒト胃由来 poly(A)⁺RNA 画分からの cDNA の合成

ヒト胃 poly(A)⁺RNA 画分 (クロンテック社、カタログ番号 6548-1) 5 μg にプライマーとしてランダム DNA ヘキサマー (BRL 社) を加え、モロニマウス白血病ウイルスの逆転写酵素 (BRL 社) により、添付バッファーを用いて相補 DNA を合成した。反応後の産物はエタノール沈殿を行なった後、30 μl の TE に溶解した。

20 【0101】

【実施例 3】ヒト胃由来 cDNA を用いた PCR 法による受容体 cDNA の増幅

実施例 2 でヒト胃より調製した cDNA 1 μl を鋳型として使用し、実施例 1 で合成した DNA プライマーを用いて PCR による増幅を行なった。反応液の組成は、合成 DNA プライマー (配列：5' プライマー配列および 3' プライマー配列) 各 100 pM、0.25 mM dNTPs (Deoxyribonucleoside triphosphate)、Taq DNA polymerase 1 μl および酵素に付属のバッファー 10 μl で、総反応溶液量は 100 μl とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー社) を用い、96℃・30 秒、45℃・1 分、60℃・3 分のサイクルを 25 回繰り返した。増幅産物の確認は 1.2% アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行なった。

【0102】

【実施例 4】PCR 産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入 cDNA 部分の塩基配列の解読によるヒト CRF₂ レセプター候補クローンの選択

40 実施例 3 で行なった PCR 後の反応産物は 1.5% のアガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分のカミソリで切り出した後、エレクトロエリユーション、フェノール抽出、エタノール沈殿を行って DNA を回収した。TAKA クローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収した DNA をプラスミドベクター pCRTMIIへサブクローニングした。これを大腸菌 JM109 competent cell (宝酒造株式会社) に導入して形質転換したのち、cDNA 挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) および X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto

side)を含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、形質転換体を100クローン得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置PI-100(クラボウ)を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(ABI社)を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列を基に、DNASIS(日立システムエンジニアリング社)を用いてホモロジー検索を行なった結果、形質転換体エシェリヒア コリ(Escherichiacoli) JM109/pHs-AH1の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片が新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。該cDNA断片の塩基配列を〔図3〕に示した。さらに確認するために、DNASIS(日立システムエンジニアリング社)を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後〔図3〕、疎水性プロット〔図4〕を行なった結果、G蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを示す疎水性ドメインが存在することが確認された。また、アミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行なった結果、ラット*

N0 5'-ATGAAGAGGAAGAGGCACCTTGCGCA-3'
(配列番号: 5)

N1 5'-CAGTGGAGTAGGTCATGACAATGGC-3'
(配列番号: 6)

次にヒト胃 poly(A)⁺RNA画分 1 μgを用いて Marathon cDNA amplification キットの方法に従って、鋳型に用いるための二本鎖cDNAを合成した。続いてこれを材料にして1回目のPCRを行った。反応液の組成は、二本鎖cDNA 5 μl、合成DNAプライマー(N0およびキットに付属しているAP1)各200 nM、200 μM dNTP、ExTaq DNA polymerase(宝酒造) 0.5 μl、および10×ExTaq用反応バッファー 5 μlで、総反応液量は水を加えて50 μlとした。増幅のための反応はサーマルサイクラー(パーキン・エルマー社)を用い、94℃・30秒、60℃・30秒、68℃・3分のサイクルを30回繰り返した。次に該反応液0.1 μlを鋳型にして2回目のPCRを行った。反応液の組成は、合成プライマー(N1およびキットに付属しているAP2)各200 nM、200 μM dNTP、ExTaq DNA polymerase 0.5 μl、10×ExTaq用反応バッファー 5 μlで、総反応液量は水を加えて50 μlとした。反応条件は94℃・30秒、6※

N11 5'-ATGATGGGGCCTTGGTAGATGTAGTCCA
CC-3' (配列番号: 7)

N12 5'-GCTCCTTGCCAAACCAGCACTGTTTCATT

* CRF2レセプター蛋白質(U16235)と96.6%、マウスCRF₂(CRF-RB)レセプター蛋白質(U17858)と93.9%、ヒトCRFレセプター蛋白質(L23332)とは84.5%のホモロジーを有していた。これは、本発明のcDNA断片が、これまで報告されていないヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードしていることを示すものである。上記の()内の略語はGenBankにデータとして登録される際の整理番号であり、通常Accession numberと呼ばれるものである。

【0103】

【実施例5】PCR法によるヒトCRF₂レセプターcDNAの5'側および3'側配列の増幅
ヒト胃 poly(A)⁺RNA画分(クロンテック社、カタログ番号6548-1)を材料にしてヒトCRF₂レセプターcDNAの5'側および3'側配列を増幅させるPCRを行った。はじめに Marathon cDNA amplification キット(クロンテック社、カタログ番号K1802-1)を用いて、実施例4で取得したヒトCRF₂レセプターcDNA断片の5'側配列を持つcDNAを増幅させるためのPCRを行った。プライマーとして実施例4で取得したヒトCRF₂レセプターcDNA断片の配列(配列番号: 4)に相補的である配列番号: 5または配列番号: 6で表される塩基配列を有する合成DNA2本を作製した。

※ 8℃・3分を25回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロミド染色によって行った。特異的に増幅されてきた約350bpの長さのDNA断片をエレクトロエリユーションでゲルから回収した。これを実施例4に記載の方法でプラスミドベクターpCRIIへクローニング後、塩基配列を決定した。その結果、回収したDNA断片は、ヒトCRF₂レセプターcDNA断片のプライマーN1の位置から5'側に向かって約350bpを含んでいることが判明した。以上の操作で得られたヒトCRF₂レセプターcDNAの塩基配列の情報を基に、さらに5'および3'側のDNA断片の増幅を行った。5'側DNA断片の増幅用には5'-AmpliFINDER RACE Kit(クロンテック社、カタログ番号K1800-1)を用いて以下のように行った。5'側を増幅させるためのプライマーとして新たに配列番号: 7または配列番号: 8で表される塩基配列を有する合成DNA2本を作製した。

69

CT-3'

次にヒト胃 poly(A)+RNA画分 2 μ g を用いて 5'-Amplicon RACE Kit の方法に従って cDNA 合成および PCR を行った。cDNA 合成の際のプライマーとして N11 を用いた。また 1 回目の PCR には、プライマーとして N12 およびキットに付属しているアンカープライマーを使用し、2 回目の PCR には先に合成した N0 およびアンカープライマーを使用した。PCR 反応の組成は、合成プライマー各 200 nM、200 μ M dNTP、ExTaq DNA polymerase 0.5 μ l、10 \times ExTaq 用反応バッファー 5 μ l で、総反応液量は水を加えて 50 μ l とした。1 回目の PCR は、94 $^{\circ}$ C \cdot 45 秒、55 $^{\circ}$ C \cdot 45 秒、68 $^{\circ}$ C \cdot 3 分を 30 回繰り返した。また 2 回目の PCR は、94 $^{\circ}$ C \cdot 45 秒、60 $^{\circ}$ C \cdot 45 秒、68 $^{\circ}$ C \cdot 3 分を 25 回繰り返した。増幅産物を *

C1 5'-GAGGACGACCTGTCTCACAGATCATGT-3'

(配列番号: 9)

C11 5'-ATTCGCTGTCTGCGGAATGTGATTCACT

GG-3'

C12 5'-CTGGAACCTCATCACCACTTTATCCTG

CG-3'

(配列番号: 10)

(配列番号: 11)

次にヒト胃 poly(A)+RNA画分 1 μ g を用いて 3' RACE System の方法に従って cDNA を合成した後、1 回目の PCR を C11 およびキットに付属のアンカープライマーを用いて行った。反応液の組成および反応条件は、前述の 5' 側 DNA 断片の増幅と同様の方法で行った。次に 2 回目の PCR をプライマーに C12 およびアンカープライマーを用いて同様に、3 回目の PCR をプライマーに C1 およびアンカープライマーを用いて同様にを行った。増幅産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動で確認した結果、約 1200 bp の DNA 断片が増幅されていたので、該 DNA 断片を上記の方法で塩基配列を解析した。その結果、回収した DNA 断片は、ヒト CRF₂ レセプター cDNA 断片のプライマー C1 の位置から 3' 方向約 1200 bp を含んでいることが判明した。以上の操作で配列番号: 15 で表されるヒト CR *

C2-F 5'-GTCGACACGCGGCTGCGGGACGCGATG

GA-3'

(配列番号: 12)

C2-R 5'-GTCGACTGTGTCAGGTGGGCGACCGAGG

GGTCA-3'

(配列番号: 13)

C2-F は、ヒト CRF₂ レセプター cDNA のスタートコドンを含む -18 ~ +5 (スタートコドン ATG の A を +1 とする) に対応するセンス配列で、C2-R は、ヒト CRF₂ レセプター cDNA のストップコドンを含む +1258 ~ +1283 に対応するアンチセンス配列である。また、両方のプライマーには 5' 末端に制限酵素部位 (SalI) を付加した。PCR 反応液の組成は、ヒト胃 cDNA 1 μ l、合成 DNA プライマー (C2-F および C2-R) 各 200 nM、200 μ M

70

(配列番号: 8)

* 1.5% アガロースゲル電気泳動で確認した結果、約 700 bp の DNA 断片が増幅されていたので、該 DNA 断片をエレクトロエリクションでゲルから回収し、実施例 4 に記載の方法でプラスミドベクター pCRIIへクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、回収した DNA 断片は、ヒト CRF₂ レセプター cDNA 断片のプライマー N0 の位置から、5' 側方向約 700 bp を含んでいることが判明した。3' 側 DNA 断片の増幅用には 3' RACE System (GIBCO BRL: カタログ番号 8373SA) を用いて以下のように行った。3' 側を増幅させるためのプライマーとして新たに配列番号: 9、配列番号: 10、または配列番号: 11 で表される塩基配列を有する合成 DNA 3 本を作製した。

※ F₂ レセプター cDNA の全コード領域を取得した。これにより、ヒト CRF₂ レセプター cDNA の全コード領域の塩基配列が判明し、配列番号: 14 で表されるヒト CRF₂ レセプター蛋白質の全アミノ酸配列がはじめて明らかになった [図 6 および図 7]。

【0104】

【実施例 6】PCR 法によるヒト CRF₂ レセプター cDNA の全コード領域を含む DNA 断片の増幅
実施例 2 で調製したヒト胃 cDNA を鋳型としてヒト CRF₂ レセプター蛋白質の全長をコードする cDNA 断片の増幅を行った。まず、実施例 5 で判明したヒト CRF₂ レセプター cDNA の配列を基に、配列番号: 12 または配列番号: 13 で表される塩基配列を有する合成 DNA 2 本を作製した。

dNTP、ExTaq DNA polymerase 0.5 μ l、および 10 \times ExTaq 用反応バッファー 5 μ l で、総反応液量は水を加えて 50 μ l とした。反応条件は、95 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、70 $^{\circ}$ C \cdot 4 分を 35 回繰り返した。反応液を 1% アガロースゲル電気泳動で確認した結果、目的とする大きさ (約 1.3 kb) の DNA 断片が特異的に増幅されていた。該 DNA 断片をエレクトロエリクションでゲルから回収し、前記の方法でプラスミドベクター pCRIIへクローニング後、自動塩基配列解析装置 370A

(アプライドバイオシステム社)で挿入DNA断片の塩基配列を解析した。その結果、該DNA断片は、実施例5で判明したヒトCRF₂レセプターcDNAの全コード領域を含有するDNA断片であることが確認された。ここで得られた複数のクローンの中でpCRF2-10を以後の実験に使用することとした。pCRF2-10はヒトCRF₂レセプターcDNAの全コード領域が制限酵素SalIまたはEcoRIで切り出すことができるため、ヒトCRF₂レセプター発現プラスミドの構築、DNAプローブの調製等に好適である。

【0105】

【発明の効果】本発明の配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有することを特徴とするDNAを用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを効率よく増幅することができる。これによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを効率よくスクリーニングし、クローニングを行うことができる。本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質は、公知のヒトCRFレセプター蛋白質のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する新規な蛋白質である。本発明のヒトCRF₂レセプター蛋白質をコードするDNAおよび該DNAにコードされるヒトCRF₂レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはヒトCRF₂レセプター蛋白質を含有する細胞もしくはその細胞膜画分は、ヒトCRF₂レセプターアゴニストまたはアンタゴニストを効率よくスクリーニングすることができる。上記のスクリーニング方法によれば、アゴニストまたはアンタゴニストを有利に選択することができるので、医薬品を早期に開発することができる。アゴニストは、例えば痴呆症、肥満症の予防・治療剤、ストレスに対する適応促進剤、ACTH、 β -エンドルフィン、 β -リポトロピンもしくは α -MSFの分泌促進剤、血圧降下剤、気分や行動の調節剤、胃腸機能の調節剤、自律神経系の調節剤、さらには*

配列

```

Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr
 1             5             10             15
Ser Thr Glu Arg Leu Arg Lys Cys Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys
      20             25             30
Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr
      35             40             45
Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Val Asp
      50             55             60
Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val
      65             70             75             80
Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser
      85             90             95
Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu
      100            105            110
Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn

```

*下垂体、心血管系、消化管もしくは中枢神経の機能検査薬などとして有用である。一方、アンタゴニストは、例えば、ストレスからくる鬱病・不安・頭痛、炎症性疾患、免疫抑制、AIDS、アルツハイマー病、胃腸障害、食欲不振、出血性ストレス、さらには薬物・アルコールの禁断症状、薬物依存症、生殖障害、クッシング病または低血圧症の予防・治療剤などとして有用である。

【0106】

【配列表】

10 【配列番号：1】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：NはIを示す。

配列

CATTAYTKGA TSGYGRCCAA CTWCWNCTGG 30

【0107】

20 【配列番号：2】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：NはIを示す。

配列

GTAGARRAYA GCCACAMMRA RNCCTGRAA 30

【0108】

30 【配列番号：3】

配列の長さ：148

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

73 115 120 125 74
 Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser Gln Ile Met Phe Ile Tyr Phe Asn Ser
 130 135 140
 Phe Leu Gln Ser
 145

【0109】

【配列番号：4】

配列の長さ：444

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

* 特徴を決定した方法：S

配列

ATGTTTGTGG AAGGCTGCTA CCTGCACACG GCCATTGTCA TGACCTACTC CACTGAGCGC 60
 CTGCGCAAGT GCCTCTTCCT CTTTCATCGGA TGGTGCATCC CCTTCCCAT CATCGTGGC 120
 TGGGCCATCG GCAAGCTCTA CTATGAGAAT GAACAGTGCT GGTTTGGCAA GGAGCCTGGC 180
 GACCTGGTGG ACTACATCTA CCAAGGCCCC ATCATTCTCG TGCTCCTGAT CAATTCGTA 240
 TTTCTGTTCA ACATCGTCAG GATCCTAATG ACAAAGTTAC GCGCGTCCAC CACATCCGAG 300
 ACAATCCAGT ACAGGAAGGC AGTGAAGGCC ACCCTGGTGC TCCTGCCCTT CCTGGGCATC 360
 ACCTACATGC TCTTCTTCGT CAATCCCGGG GAGGACGACC TGTCACAGAT CATGTTTCATC 420
 TATTTCAACT CCTTCCTGCA GTCG 444

【0110】

【配列番号：5】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGAAGAGGA AGAGGCACTT GCG
 CA 25

【0111】

【配列番号：6】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAGTGGAGTA GGTCATGACA ATG
 GC 25

【0112】

【配列番号：7】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATGATGGGGC CTTGGTAGAT GTAGTCCACC 30

【0113】

【配列番号：8】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

20 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTCCTTGCC AAACCAGCAC TGT
 TCATTCT 30

【0114】

【配列番号：9】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

30 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAGGACGACC TGTCACAGAT CAT
 GT 25

【0115】

【配列番号：10】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

40 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATTCGCTGTC TGCGGAATGT GATTCCTGG 30

【0116】

【配列番号：11】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

50 トポロジー：直鎖状

75

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGGAACCTC ATCACCACCT TTA
TCCTGCG 30

【0117】

【配列番号：12】

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCGACACGC GGCTGCGGGA CGC
GATGGA 29

【0118】

*

配列

Met Asp Ala Ala Leu Leu His Ser Leu Leu Glu Ala Asn Cys Ser Leu
1 5 10 15
Ala Leu Ala Glu Leu Leu Leu Asp Gly Trp Gly Pro Pro Leu Asp
20 25 30
Pro Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Cys Asn Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly
35 40 45
Thr Cys Trp Pro Arg Ser Ala Ala Gly Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys
50 55 60
Pro Glu Tyr Phe Asn Gly Val Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr
65 70 75 80
Arg Glu Cys Leu Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Lys Ile Asn Tyr Ser
85 90 95
Gln Cys Glu Pro Ile Leu Asp Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp Leu His
100 105 110
Tyr Arg Ile Ala Leu Val Val Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Val
115 120 125
Ala Ala Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe Leu Ala Leu Arg Ser Ile
130 135 140
Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile
145 150 155 160
Leu Arg Asn Val Met Trp Phe Leu Leu Gln Leu Val Asp His Glu Val
165 170 175
His Glu Ser Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile Phe Asn
180 185 190
Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr
195 200 205
Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Leu Arg Lys
210 215 220
Cys Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val
225 230 235 240
Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe
245 250 255
Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile
260 265 270

76

* 【配列番号：13】

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCGACTGTG CAGGTGGGCG ACCGAGGGGT CA 32

【0119】

10 【配列番号：14】

配列の長さ：411

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

77 78
 Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg
 275 280 285
 Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln
 290 295 300
 Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly
 305 310 315 320
 Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser
 325 330 335
 Gln Ile Met Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly
 340 345 350
 Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser
 355 360 365
 Ala Val Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser Leu Arg
 370 375 380
 Val Pro Met Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile
 385 390 395 400
 Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
 405 410

【0120】

【配列番号：15】

配列の長さ：1277

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

20 トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

* 特徴を決定した方法：S

配列

ACGCGGCTGC GGGACGCGAT GGACGCGGCA CTGCTCCACA GCCTGCTGGA GGCCAACTGC 60
 AGCCTGGGCG TGGCTGAAGA GCTGCTCTTG GACGGCTGGG GGCCACCCCT GGACCCCGAG 120
 GGTCCCTACT CCTACTGCAA CACGACCTTG GACCAGATCG GAACGTGCTG GCGCCGCGAGC 180
 GCTGCGGAG CCCTCGTGGA GAGGCCGTGC CCGAGTACT TCAACGCGGT CAAGTACAAC 240
 ACGACCGGA ATGCCTATCG AGAATGCTTG GAGAATGGGA CGTGGGCCTC AAAGATCAAC 300
 TACTCACAGT GTGAGCCCAT TTTGGATGAC AAGCAGAGGA AGTATGACCT GCACTACCGC 360
 ATCGCCCTTG TCGTCAACTA CCTGGGCCAC TCGTATCTG TGGCAGCCCT GGTGGCCGCC 420
 TTCCTGCTTT TCCTGGCCCT GCGGAGCATT CGCTGTCTGC GGAATGTGAT TCACTGGAAC 480
 CTCATACCA CCTTTATCCT GCGAAATGTC ATGTGGTTCC TGCTGCAGCT CGTTGACCAT 540
 GAAGTGACG AGAGCAATGA GGTCTGGTGC CGCTGCATCA CCACCATCTT CAACTACTTC 600
 GTGGTGACCA ACTTCTTCTG GATGTTTGTG GAAGGCTGCT ACCTGCACAC GGCCATTGTC 660
 ATGACCTACT CCACTGAGCG CCTGCGCAAG TGCCTCTTCC TCTTCATCG ATGGTGCATC 720
 CCCTTCCCCA TCATCGTCGC CTGGGCCATC GGCAAGCTCT ACTATGAGAA TGAACAGTGC 780
 TGGTTTGGA AGGAGCCTGG CGACCTGGTG GACTACATCT ACCAAGGCCC CATCATTCTC 840
 GTGCTCCTGA TCAATTCGT ATTTCTGTTT AACATCGTCA GGATCCTAAT GACAAAGTTA 900
 CGCGCGTCCA CCACATCCGA GACAATCCAG TACAGGAAGG CAGTGAAGGC CACCCTGGTG 960
 CTCCTGCCCC TCCTGGGCAT CACCTACATG CTCTTCTTCG TCAATCCCGG GGAGGACGAC 1020
 CTGTACAGA TCATGTTTAT CTATTTCAAC TCCTTCCTGC AGTCGTTCCA GGGTTTCTTC 1080
 GTGTCTGTCT TCTACTGCTT CTTCAATGGA GAGGTGCGCT CAGCCGTGAG GAAGAGGTGG 1140
 CACCGCTGGC AGGACCATCA CTCCCTTCGA GTCCCATGG CCCGGGCCAT GTCCATCCCT 1200
 ACATACCCA CACGGATCAG CTTCCACAGC ATCAAGCAGA CGGCCGCTGT GTGACCCCTC 1260
 GGTGCGCCAC CTGCACA 1277

【0121】

【図面の簡単な説明】

【図1】配列番号：1で表される塩基配列を有する5'側の合成DNAプライマー（TM3-C）の配列と、他のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDN 50

Aあるいは遺伝子の塩基配列との共通性を示した図である。

【図2】配列番号：2で表される塩基配列を有する3'側の合成DNAプライマー（TM7-D）に相補的な塩基配列と、他のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコー

ドするcDNAあるいは遺伝子の塩基配列との共通性を示した図である。

【図3】本発明のヒトCRF₂レセプターcDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。塩基配列の5'端および3'端に示した下線部分は、PCR増幅に用いた合成プライマーに相当する。

【図4】図3に示したアミノ酸配列をもとに作成した、ヒトCRF₂レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の疎水性プロットを示す。この図からTM3～TM7で示す疎水性ドメインの存在が明らかである。

【図5】図3に示したヒトCRF₂レセプターcDNA断片にコードされる蛋白質の部分アミノ酸配列(p h s-AH1)を、公知のラットCRF₂レセプター蛋白質(RNU16253)と比較した図を示す。黒く塗った部分は一致しているアミノ酸残基を示す。下線部分は、PCRで使用したプライマー部分を示す。

【図1】

5'側のプライマー配列

primer TM3-C	CATTACTTGATCGCGACCAACTACAICTGG
	T G G T G T T
X82466	CAGTACATGATGGCTGCAACTATTCTGG
X68596	CTTTACTTCTGGCCACCAACTACTACTGG
U03469	CAATATGGCATCGTGGCCAACTACTGCTGG
U01156	CAGTACTGTGTGGCGGCAATTACTACTGG
X59132	CAGTACTGCATCATGGCCAACTACGCATGG
L01406	CATTTGCCACCATGACCAACTTCAGCTGG
D17516	CAGTACTGTGTGTGTGTCCTCACTCTCTGG
Z23279	CAGTACTGTGTGTGTGTCCTCACTCTCTGG
X75299	CAATATTGTGTGTGTGTCCTCACTCTCTGG
L36566	CAGTACTGCATCATGGCCAACTCTCTCTGG
L23332	CAGTACTGCATCATGGCCAACTCTCTCTGG
U16253	CAGTACTGCATCATGGCCAACTCTCTCTGG
primer TM3-C	5'-CATTAYTKGATSGYGRCCAACCTWCNICTGG-3'
	Y:C/T, K:G/T, S:G/C, R:A/G, W:A/T, I:イノシン

X82466: ヒト カルシトニン受容体
 X68596: ヒト パラチロイド ホルモン受容体
 U03469: ヒト グルカゴン受容体
 U01156: ヒト グルカゴン-ライク ポリペプチド-1受容体
 X59132: ラット セクレチン受容体
 L01406: ヒト グロースホルモン放出ホルモン受容体
 D17516: ヒト ビチュイタリー アデニレート サイクレース
 -アクティベート ポリペプチド受容体
 Z23279: ラット ビチュイタリー アデニレート サイクレース
 -アクティベート ポリペプチド受容体
 X75299: ヒト パソアクティブ インテスティナル ペプチド
 受容体
 L36566: ヒト ビップ2受容体
 L23332: ヒト コルチコトロピン放出ファクター 受容体
 U16253: ラット コルチコトロピン放出ファクター2受容体

* 【図6】本発明のヒトCRF₂レセプターcDNA断片の塩基配列(スタートコドンATGのAを+1とした時の-18～+630)およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。

【図7】本発明のヒトCRF₂レセプターcDNA断片の塩基配列(スタートコドンATGのAを+1とした時の+631～+1259)およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。

【図8】図6および図7に示したアミノ酸配列をもとに作成した、ヒトCRF₂レセプター蛋白質の疎水性プロットを示す。この図から、TM1～TM7で示す疎水性ドメインの存在が明らかである。

【図9】図6および図7に示したアミノ酸配列を、公知のラットCRF₂レセプター蛋白質(RNU16253)と比較した図を示す。黒く塗った部分はアミノ酸残基が両者で一致していることを示す。

【図2】

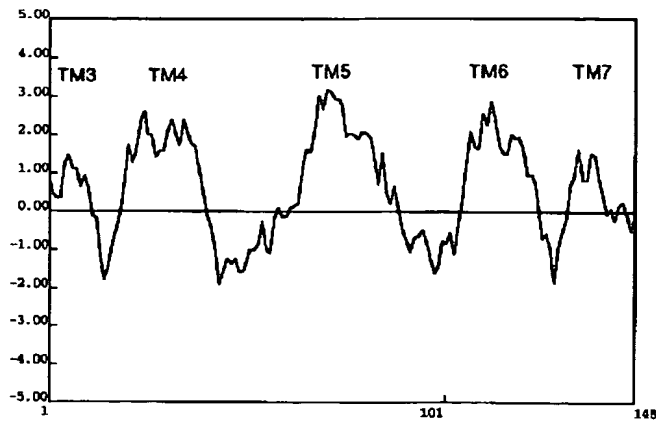
3'側のプライマー配列

primer TM7-D	TTCCAGGGICTCGTGGTGGCTATCCTCTAC
の相補配列	T T T T G T T
X82466	TTCCAGGGCTTCTTTGTGCGACCATCTAC
X68596	TTCCAGGGATTTTTGTGCGCAATCATATAC
U03469	TTCCAGGGCTGCTGGTGGCTGTCCTCTAC
U01156	TTCCAGGGCTGCTGGTGGCCATCTTATAC
X59132	TTCCAGGGCTGCTGGTAGCTGTCCTTTAC
L01406	TTCCAGGGCTTCATTGTGCGCATCCTCTAC
D17516	TTCCAGGGCTTTGTGGTGGCTGTTCTCTAC
Z23279	TTCCAGGGCTTTGTGGTGGCTGTTCTCTAC
X75299	TTCCAGGGCTTTGTGGTGGCTATCCTCTAC
L36566	TTCCAGGGCTGCTGGTGGCCGTCCTCTAC
L23332	TTCCAGGGCTTCTTTGTGTCTGTGTTCTAC
U16253	TTCCAGGGCTTCTTTGTGTCTGTGTTCTAC

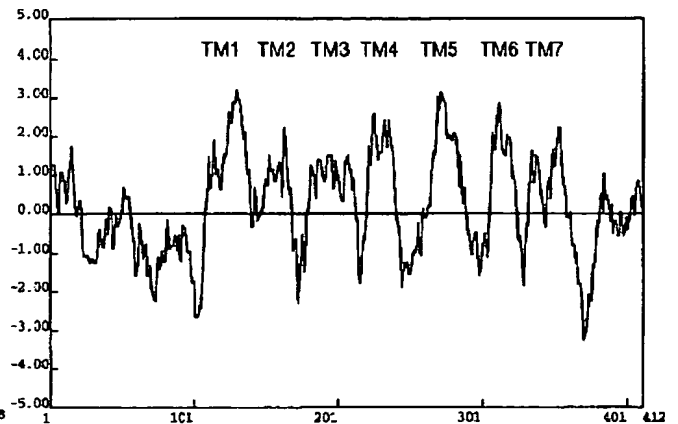
primer TM7-D 5'-GTAGARRAYAGCCACMAMRARICTTGAA-3'
 R:A/G, Y:C/T, M:A/C, I:イノシン

5'	9			18			27			36			45			54		
	CAT	TAT	TTG	ATG	GCG	GCC	AAC	TAC	TGC	TGG	ATG	TTT	GTG	GAA	GGC	TGC	TAC	CTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
											Met	Phe	Val	Glu	Gly	Cys	Tyr	Leu
	63			72			81			90			99			108		
	CAC	ACG	GCC	ATT	GTC	ATG	ACC	TAC	TCC	ACT	GAG	CGC	CTG	CGC	AAG	TGC	CTC	TTC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	His	Thr	Ala	Ile	Val	Met	Thr	Tyr	Ser	Thr	Glu	Arg	Leu	Arg	Lys	Cys	Leu	Phe
	117			126			135			144			153			162		
	CTC	TTC	ATC	GGA	TGG	TGC	ATC	CCC	TTC	CCC	ATC	ATC	GTG	GCC	TGG	GCC	ATC	GGC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Leu	Phe	Ile	Gly	Trp	Cys	Ile	Pro	Phe	Pro	Ile	Ile	Val	Ala	Trp	Ala	Ile	Gly
	171			180			189			198			207			216		
	AAG	CTC	TAC	TAT	GAG	AAT	GAA	CAG	TGC	TGG	TTT	GGC	AAG	GAG	CCT	GGC	GAC	CTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Lys	Leu	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Glu	Gln	Cys	Trp	Phe	Gly	Lys	Glu	Pro	Gly	Asp	Leu
	225			234			243			252			261			270		
	GTG	GAC	TAC	ATC	TAC	CAA	GGC	CCC	ATC	ATT	CTC	GTG	CTC	CTG	ATC	AAT	TTC	GTA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Val	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Gly	Pro	Ile	Ile	Leu	Val	Leu	Leu	Ile	Asn	Phe	Val
	279			288			297			306			315			324		
	TTT	CTG	TTC	AAC	ATC	GTC	AGG	ATC	CTA	ATG	ACA	AAG	TTA	CGC	GCG	TCC	ACC	ACA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Phe	Leu	Phe	Asn	Ile	Val	Arg	Ile	Leu	Met	Thr	Lys	Leu	Arg	Ala	Ser	Thr	Thr
	333			342			351			360			369			378		
	TCC	GAG	ACA	ATC	CAG	TAC	AGG	AAG	GCA	GTG	AAG	GCC	ACC	CTG	GTG	CTC	CTG	CCC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Ser	Glu	Thr	Ile	Gln	Tyr	Arg	Lys	Ala	Val	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Leu	Leu	Pro
	387			396			405			414			423			432		
	CTC	CTG	GGC	ATC	ACC	TAC	ATG	CTC	TTC	TTC	GTC	AAT	CCC	GGG	GAG	GAC	GAC	CTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Leu	Leu	Gly	Ile	Thr	Tyr	Met	Leu	Phe	Phe	Val	Asn	Pro	Gly	Glu	Asp	Asp	Leu
	441			450			459			468			477			486		
	TCA	CAG	ATC	ATG	TTC	ATC	TAT	TTC	AAC	TCC	TTC	CTG	CAG	TCG	<u>TTC</u>	<u>CAG</u>	<u>GGC</u>	<u>TTC</u>
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Ser	Gln	Ile	Met	Phe	Ile	Tyr	Phe	Asn	Ser	Phe	Leu	Gln	Ser				
	495																	

【図4】



【図8】



【図5】

RNU16253, RAT	10	20	30	40	50	
hS-AH1,5-3,a	1 MDAALLSL	EANCSLALAE	ELLLDGWGE	PDPEGPYSYC	NITLDQIGTC	50
	-191					-142
RNU16253, RAT	60	70	80	90	100	
hS-AH1,5-3,a	51 WPQSAPGALV	ERPCPEYFNG	IKYNITRNAY	RECLNGTWA	SRINYSHCEP	100
	-141					-92
RNU16253, RAT	110	120	130	140	150	
hS-AH1,5-3,a	101 ILDDKQRKYD	LHYRIALIN	YLGHCVSVA	LVA AFLFLV	LR SIRCLRN	150
	-91					-42
RNU16253, RAT	160	170	180	190	200	
hS-AH1,5-3,a	151 IHWNLTITFI	LRNITWFLQ	LIDHEVHEGN	EWCRCVITI	FNFVVTNEF	200
	-41					9
RNU16253, RAT	210	220	230	240	250	
hS-AH1,5-3,a	201 WMFVEGCYLH	TAIVMTYSTE	HERNWLFLFI	GWCIPTPIEV	AWATGKLYYE	250
	10 WMFVEGCYLH	TAIVMTYSTE	RLRKLFLFI	GWCIPTPIEV	AWATGKLYYE	59
RNU16253, RAT	260	270	280	290	300	
hS-AH1,5-3,a	251 NECCWEGKEF	GDVVDYIYQG	PIILVLLINE	VFLFNIVRIL	MTKLRASTTS	300
	60 NECCWEGKEF	GDVVDYIYQG	PIILVLLINE	VFLFNIVRIL	MTKLRASTTS	109
RNU16253, RAT	310	320	330	340	350	
hS-AH1,5-3,a	301 ETIQYRKAVK	ATLVLLPLLG	ITYMLFFVNP	GEDDLSQIMF	IYFNSFLQSF	350
	110 ETIQYRKAVK	ATLVLLPLLG	ITYMLFFVNP	GEDDLSQIMF	IYFNSFLQSF	159
RNU16253, RAT	360	370	380	390	400	
hS-AH1,5-3,a	351 QGFVSVFYC	FFNGEVRSA	RKRWRWDH	KALRVPVARA	MSIPTSPTRI	400
	160 QGFVSVFYC					209
RNU16253, RAT	410	420	430	440	450	
hS-AH1,5-3,a	401 SFHSIKQTAA	V.....				450
	210					259

		-10					1										36	
5'	ACG	CGG	CTG	CGG	GAC	GCG	ATG	GAC	GCG	GCA	CTG	CTC	CAC	AGC	CTG	CTG	GAG	GCC
							Met	Asp	Ala	Ala	Leu	Leu	His	Ser	Leu	Leu	Glu	Ala
																		90
	AAC	TGC	AGC	CTG	GCG	CTG	GCT	GAA	GAG	CTG	CTC	TTG	GAC	GGC	TGG	GGG	CCA	CCC
	Asn	Cys	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Gly	Trp	Gly	Pro	Pro
																		144
	CTG	GAC	CCC	GAG	GGT	CCC	TAC	TCC	TAC	TGC	AAC	ACG	ACC	TTG	GAC	CAG	ATC	GGA
	Leu	Asp	Pro	Glu	Gly	Pro	Tyr	Ser	Tyr	Cys	Asn	Thr	Thr	Leu	Asp	Gln	Ile	Gly
																		198
	ACG	TGC	TGG	CCC	CGC	AGC	GCT	GCC	GGA	GCC	CTC	GTG	GAG	AGG	CCG	TGC	CCC	GAG
	Thr	Cys	Trp	Pro	Arg	Ser	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Arg	Pro	Cys	Pro	Glu
																		252
	TAC	TTC	AAC	GGC	GTC	AAG	TAC	AAC	ACG	ACC	CGG	AAT	GCC	TAT	CGA	GAA	TGC	TTG
	Tyr	Phe	Asn	Gly	Val	Lys	Tyr	Asn	Thr	Thr	Arg	Asn	Ala	Tyr	Arg	Glu	Cys	Leu
																		306
	GAG	AAT	GGG	ACG	TGG	GCC	TCA	AAG	ATC	AAC	TAC	TCA	CAG	TGT	GAG	CCC	ATT	TTG
	Glu	Asn	Gly	Thr	Trp	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gln	Cys	Glu	Pro	Ile	Leu
																		360
	GAT	GAC	AAG	CAG	AGG	AAG	TAT	GAC	CTG	CAC	TAC	CGC	ATC	GCC	CTT	GTC	GTC	AAC
	Asp	Asp	Lys	Gln	Arg	Lys	Tyr	Asp	Leu	His	Tyr	Arg	Ile	Ala	Leu	Val	Val	Asn
																		414
	TAC	CTG	GGC	CAC	TGC	GTA	TCT	GTG	GCA	GCC	CTG	GTG	GCC	GCC	TTC	CTG	CTT	TTC
	Tyr	Leu	Gly	His	Cys	Val	Ser	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Phe	Leu	Leu	Phe
																		468
	CTG	GCC	CTG	CGG	AGC	ATT	CGC	TGT	CTG	CGG	AAT	GTG	ATT	CAC	TGG	AAC	CTC	ATC
	Leu	Ala	Leu	Arg	Ser	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Asn	Val	Ile	His	Trp	Asn	Leu	Ile
																		522
	ACC	ACC	TTT	ATC	CTG	CGA	AAT	GTC	ATG	TGG	TTC	CTG	CTG	CAG	CTC	GTT	GAC	CAT
	Thr	Thr	Phe	Ile	Leu	Arg	Asn	Val	Met	Trp	Phe	Leu	Leu	Gln	Leu	Val	Asp	His
																		576
	GAA	GTG	CAC	GAG	AGC	AAT	GAG	GTC	TGG	TGC	CGC	TGC	ATC	ACC	ACC	ATC	TTC	AAC
	Glu	Val	His	Glu	Ser	Asn	Glu	Val	Trp	Cys	Arg	Cys	Ile	Thr	Thr	Ile	Phe	Asn
																		630
	TAC	TTC	GTG	GTG	ACC	AAC	TTC	TTC	TGG	ATG	TTT	GTG	GAA	GGC	TGC	TAC	CTG	CAC
	Tyr	Phe	Val	Val	Thr	Asn	Phe	Phe	Trp	Met	Phe	Val	Glu	Gly	Cys	Tyr	Leu	His

【図 7】

684
 ACG GCC ATT GTC ATG ACC TAC TCC ACT GAG CGC CTG CGC AAG TGC CTC TTC CTC
 Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Leu Arg Lys Cys Leu Phe Leu

738
 TTC ATC GGA TGG TGC ATC CCC TTC CCC ATC ATC GTC GCC TGG GCC ATC GGC AAG
 Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys

792
 CTC TAC TAT GAG AAT GAA CAG TGC TGG TTT GGC AAG GAG CCT GGC GAC CTG GTG
 Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Val

846
 GAC TAC ATC TAC CAA GGC CCC ATC ATT CTC GTG CTC CTG ATC AAT TTC GTA TTT
 Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe

900
 CTG TTC AAC ATC GTC AGG ATC CTA ATG ACA AAG TTA CGC GCG TCC ACC ACA TCC
 Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser

954
 GAG ACA ATC CAG TAC AGG AAG GCA GTG AAG GCC ACC CTG GTG CTC CTG CCC CTC
 Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu

1008
 CTG GGC ATC ACC TAC ATG CTC TTC TTC GTC AAT CCC GGG GAG GAC GAC CTG TCA
 Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser

1062
 CAG ATC ATG TTC ATC TAT TTC AAC TCC TTC CTG CAG TCG TTC CAG GGT TTC TTC
 Gln Ile Met Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe

1116
 GTG TCT GTC TTC TAC TGC TTC TTC AAT GGA GAG GTG CGC TCA GCC GTG AGG AAG
 Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser Ala Val Arg Lys

1170
 AGG TGG CAC CGC TGG CAG GAC CAT CAC TCC CTT CGA GTC CCC ATG GCC CGG GCC
 Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser Leu Arg Val Pro Met Ala Arg Ala

1224
 ATG TCC ATC CCT ACA TCA CCC ACA CGG ATC AGC TTC CAC AGC ATC AAG CAG ACG
 Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr

1259
 GCC GCT GTG TGA CCC CTC GGT CGC CCA CCT GCA CA 3'
 Ala Ala Val ***

【図9】

hCRF2.ami	1	10	20	30	40	50	
rat CRF2.ami	1	10	20	30	40	50	50
		MDAALLSL	EANCSLALAE	ELLLDGWGP	PDPEGPYSYC	NTILDQIGTC	50
		MDAALLSL	EANCSLALAE	ELLLDGWGP	PDPEGPYSYC	NTILDQIGTC	50
hCRF2.ami	51	60	70	80	90	100	
rat CRF2.ami	51	60	70	80	90	100	100
		WPRSAAGALV	ERPCPEYFNG	VKYNTRRNAY	RXTLNGTWA	SKINYSQCEP	100
		WPRSAAGALV	ERPCPEYFNG	VKYNTRRNAY	RECLNGTWA	SRINYSQCEP	100
hCRF2.ami	101	110	120	130	140	150	
rat CRF2.ami	101	110	120	130	140	150	150
		ILDDKQKRYD	LHYRIALVN	YLGHCVSVA	LVAAFLLFLA	LSIRCLRIM	150
		ILDDKQKRYD	LHYRIALVN	YLGHCVSVA	LVAAFLLFLV	LSIRCLRIM	150
hCRF2.ami	151	160	170	180	190	200	
rat CRF2.ami	151	160	170	180	190	200	200
		LHWNLITTFI	LRNVMWFLLO	LDHEVHESN	EVWCRCVITI	FNYFVVTNFF	200
		LHWNLITTFI	LRNITWFLLO	LDHEVHESN	EVWCRCVITI	FNYFVVTNFF	200
hCRF2.ami	201	210	220	230	240	250	
rat CRF2.ami	201	210	220	230	240	250	250
		WMFVECCYLH	TAIVMTYSTE	RURKCLFLFI	GWCIPTIIV	AWAVGKLYYE	250
		WMFVECCYLH	TAIVMTYSTE	HLRKCLFLFI	GWCIPTIIV	AWAVGKLYYE	250
hCRF2.ami	251	260	270	280	290	300	
rat CRF2.ami	251	260	270	280	290	300	300
		NEQCWFGKEP	GDLVDYIYQG	PIILVLLINE	VFLFNIVRII	MTKLRASTTS	300
		NEQCWFGKEP	GDLVDYIYQG	PIILVLLINE	VFLFNIVRII	MTKLRASTTS	300
hCRF2.ami	301	310	320	330	340	350	
rat CRF2.ami	301	310	320	330	340	350	350
		ETIOYRKAVK	ATLVLLPLLG	ITYMLFFVNF	GEDDLSQIME	IYFNSFLOSF	350
		ETIOYRKAVK	ATLVLLPLLG	ITYMLFFVNF	GEDDLSQIME	IYFNSFLOSF	350
hCRF2.ami	351	360	370	380	390	400	
rat CRF2.ami	351	360	370	380	390	400	400
		QGFEVSVFYC	FNCEVRSAY	RRRWITKQDH	HLRVPMARA	NSIPTSPTRI	400
		QGFEVSVFYC	FNCEVRSAL	RKRWRHRODH	HLRVPMARA	NSIPTSPTRI	400
hCRF2.ami	401	410	420	430	440	450	
rat CRF2.ami	401	410	420	430	440	450	450
		SEHSIKQTAA	450
		SEHSIKQTAA	450

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	Z
G 0 1 N 33/566			G 0 1 N 33/566	
// A 6 1 K 38/00	A A M		A 6 1 K 37/02	A A M
	A B U			A B U
	A D D			A D D
	A A T		37/43	A A T
	A C J			A C J
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				